1330

66

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 18

1975

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 18, nr. 1, p. 1—64, Bucureşti, 1975

SCBIAS — 18 (1), 1 — 64 (1975)

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

CECILIA MOTAŞ

Revista apare de 2 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 40 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii. Revista se poate procura (direct sau prin poştă) şi prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Toate comenzile externe pentru lucrările apărute în Editura Academiei Republicii Socialiste România se vor adresa la ILEXIM, SERVICIUL EXPORT—IMPORT CARTE; SERVICIUL EXPORT—IMPORT PRESA (pentru reviste); P. O. BOX 2001, Calea Griviţei nr. 64—65, Bucureşti, oficiul poştal 12, România.

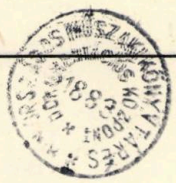
Manualele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie": Bucureşti, str. Docenţilor, nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

Bucureşti, Calea Victoriei 125, sectorul 1

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 18, nr. 1 1975



SUMAR

E. ILIESCU, Aspecte biochimice ale diferenţierii mugurilor floriferi la măr. I. Conţinutul cîtorva forme de azot în organele pomilor cu şi fără fructe 3

V. MOGA, Contribuţie la studiul aminoacizilor liberi din alge 13

L. POPA, Acumularea aminoacizilor în mediul de cultură al unor specii de levuri 17

F. ROTTENBERG, Rotaţia specifică a soluţiilor şi gelurilor de gelatină 23

H. D. SCHELL, I. CORNOIU, TR. BENŢIA, Studiul proprietăţilor fizico-chimice şi mecanice ale agaroidului din alga *Phyllophora nervosa* (Marea Neagră) 29

L. SCOLNIC, Influenţa ionilor de potasiu, rubidiu şi cesiu asupra nivelului fosfocreatinei din muşchiul gastrocnemian de broască 37

*** Propuneri de norme generale pentru nomenclatura română şi notaţiile folosite în biochimie 45

RECENZII 57

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 18, nº 1 1975

CONTENTS

E. ILIESCU, Biochemical aspects of floral bud differentiation in apple trees. I. The content of some forms of nitrogen in the organs of apple trees with or without fruits 3

V. MOGA, Contributions to the study of free aminoacids from algas 13

L. POPA, The accumulation of amino acids in the culture medium of some yeast species 17

F. ROTTENBERG, Specific rotation of gelatin solutions and gels 23

H. D. SCHELL, I. CORNOIU, TR. BENȚIA, The study of physicochemical and mechanical properties of the agaroid from alga *Phyllophora nervosa* (Black sea) 29

L. SCOLNIC, The influence of K^+, Rb^+, and Cs^+ ions on creatine phosphate level in frog gastrocnemius muscles 37

*** Recomandations and general rules for romanian notations used in biochemistry 45

BOOK REVIEW 57

ST. CERC. BIOCHIM., 18. 1, 3–11 (1975)

ASPECTE BIOCHIMICE ALE DIFERENȚIERII MUGURILOR FLORIFERI, LA MĂR. I. CONȚINUTUL CÎTORVA FORME DE AZOT ÎN ORGANELE POMILOR CU ȘI FĂRĂ FRUCTE

ELENA ILIESCU

Rezumat. — S-au studiat meri de soiul autohton Creţesc, care manifestă o periodicitate de rodire tipică, determinîndu-se azotul total, proteic şi aminic în rădăcini, frunze şi burse, în anii 1970—1971.

La pomii cu fructe, la care nu se diferenţiază muguri floriferi, pentru recolta anului viitor, rădăcinile fibroase conţin mai mult azot total şi aminic şi mai puţin proteic, în timpul iernii, de cînd începe activitatea lor, şi primăvara. La rădăcinile mai groase (Ø de 5—10 şi 11—20 mm), diferenţele persistă şi în timpul verii.

Frunzele pomilor cu fructe conţin, de asemenea, mai mult azot total şi aminic, fără diferenţe semnificative, însă, în privinţa celui proteic.

Bursele, formaţiunile pe care se diferenţiază mugurii floriferi, cînd pomii nu au fructe, conţin mai mult azot total şi proteic şi mai puţin azot aminic decît la pomii la care ele poartă fructe.

Activitatea rădăcinilor de absorbţie a azotului din sol încă din timpul iernii atestă necesitatea fertilizării diferenţiate cu azot toamna şi primăvara de timpuriu.

Diferenţierea mugurilor floriferi reprezintă un proces morfogenetic şi, ca atare, este o urmare a unor schimbări precise ce se petrec în biochimismul celulei. Se ştie că geometria celulei este dictată de structura moleculară a polimerilor înşişi, iar aceasta — la rîndul ei — depinde de reacţiile biochimice ale celulei vii (1). Procesul este ritmic, bienial, formaţiunile fructifere cu fructe nediferenţiind în anul respectiv, ci în cel următor (2, 3, 4, 5), instituindu-se o alternanţă anuală a rodirii.

Problema alternanţei rodirii este una dintre cele mai arzătoare probleme ale producţiei pomicole şi cunoaşterea temeinică a biochimismului procesului de diferenţiere a mugurilor floriferi aduce înlesniri în punerea la punct a tehnologiei tăierilor şi fertilizării, prin care se realizează echilibrul necesar între creşterea lăstarilor şi a fructelor.

Studiile biochimice asupra procesului de diferenţiere a mugurilor floriferi sînt numeroase şi, deşi unele concluzii concordă, în linii mari, au neajunsul că s-au făcut numai pe unele organe şi la intervale de timp mari. Determinări ale conţinutului de azot în frunze şi lăstari (6, 7, 8) au stabilit valori mai mari la pomii cu fructe, adică la cei care nu diferenţiază muguri floriferi.

În studiul preconizat de noi ne-am propus să cuprindem în analizele biochimice pomul în întregime, cu organele sale principale, în acelaşi timp şi într-o dinamică mai strînsă, cu privire la prezenţa formelor de azot total, proteic şi aminic.

MATERIALE ŞI METODE

Studiul s-a efectuat în anii 1970—1971, pe meri din soiul autohton Creţesc (care se caracterizează printr-o alternanţă de rodire tipică, totală), în vîrstă de 18 ani, la Staţiunea experimentală pomicolă Voineşti—Dîmboviţa.

S-au ales, din aceeaşi parcelă, pomi cu fructe (*A*) şi fără fructe (*B*) în anul 1970, aceştia fiind în situaţie total inversată în anul 1971. S-au analizat rădăcini, frunze şi burse de-a lungul întregului an, cuprinzînd toate fazele dezvoltării plantei : primăvara de timpuriu (burse), vara (burse, frunze, rădăcini), toamna tîrziu (burse, rădăcini), iarna (rădăcini).

La rădăcini s-au ales trei mărimi : I — cu diametrul mai mic de 3 mm (fibroase), II — cu diametrul de 5—10 mm şi III — cu diametrul de 11—20 mm. După recoltare, acestea s-au spălat imediat foarte bine, s-au zvîntat în tifon, s-au mărunţit rapid şi s-au fixat la 100°C, timp de 20 (I) şi 25 min (II şi III). Din partea aeriană s-au luat burse, împreună cu rozeta de frunze şi mugurele aferent, de pe ramuri de 3—5 ani, din cele patru puncte cardinale ale coroanei, la înălţimea de 1,5—1,8 m. Bursele s-au şters cu un tifon umed şi apoi cu altul uscat, s-au mărunţit rapid şi s-au fixat la 100°C, timp de 25 min. Frunzele detaşate s-au şters cu un tampon de vată umed şi apoi cu tifon uscat, s-au îndepărtat peţiolul şi nervura principală, iar limbul s-a fixat la 100°C, timp de 10 min. Ambele variante (*A* şi *B*) s-au lucrat în cîte trei repetiţii, iar fiecare repetiţie a fost alcătuită din 4 pomi, cu excepţia probelor de rădăcini, unde repetiţia a constituit-o un singur pom.

Azotul total s-a determinat după metoda clasică Kjeldahl ; azotul proteic — la fel, în urma precipitării după Barnstein ; azotul aminic — după metoda Van Slyke.

Rezultatele s-au raportat la substanţa uscată şi s-au prelucrat statistic, după metoda uzuală (9).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În luna mai, curînd după înflorire şi legarea fructelor, rădăcinile pomilor cu fructe (*A*) conţin semnificativ mai mult azot total (tabelul 1) decît pomii fără fructe (*B*), dovedind o activitate sensibil crescută de absorbţie din sol a acestui element, atît de necesar metabolismului intens la nivelul fructelor. Situaţia este asemănătoare la nivelul tuturor categoriilor de rădăcini.

În frunze (tabelul 2) se găseşte mai mult azot total tot la pomii cu fructe, cu o diferenţă foarte semnificativă faţă de cei fără fructe, manifestată atît în anul 1970 cît şi în anul 1971 (în al doilea an, diferenţa dintre pomii *A* şi *B* devenind negativă). Faptul atestă, încă o dată, înaltul potenţial metabolic la pomii cu fructe, reclamat, desigur, de creşterea şi dezvoltarea acestora.

La rădăcinile fibroase (I) nu se mai menţin diferenţe semnificative în timpul verii şi al toamnei (iulie şi octombrie), ci acestea apar, cu semn opus, în timpul iernii : la pomii *B*, ce vor avea fructe în 1971, activitatea acestor rădăcini începe încă de acum (ianuarie), întrecînd semnificativ conţinutul de azot total al celor de la pomii *A*, care nu vor avea fructe ; diferenţa se menţine semnificativă şi în luna mai, situaţie analogă cu cea a anului precedent. La rădăcinile II, mai groase, diferenţa distinct şi foarte semnificativ pozitivă a pomilor *A* faţă de pomii *B* se menţine şi în timpul verii şi toamnei, nemanifestîndu-se iarna. Menţinerea unor nivele semnificativ diferite în rădăcinile mai groase, în perioade în care în rădă-

Tabela 1

Conținutul de azot total în rădăcini (1970–1971) (g%s.u. – media a 3 repetiții)

Data	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnificația diferenței *A* – *B*	DL 5%	DL 1%	DL 0,1%
	I – Ø 3 mm					
13.V. 1970	1,332	0,984	x	0,358		
21.VII. „	0,887	0,857	–			
21.X. „	1,092	1,096	–			
25.I. 1971	1,023	1,493	o	0,342		
17.V. „	0,877	1,270	o	0,361		
	II – Ø = 5–10 mm					
13.V. 1970	1,392	1,008	xx		0,322	
21.VII. „	1,581	0,889	xx		0,506	
21.X. „	1,315	0,943	xxx			0,141
25.I. 1971	1,318	1,113	–			
17.V. „	1,010	1,341	ooo			0,309
	III–Ø = 11–20 mm					
13.V. 1970	1,069	0,768	x	0,297		
21.VII. „	0,961	0,645	xx		0,305	
21.X. „	0,911	0,962	–			
25.I. 1971	1,139	0,954	–			
17.V. „	0,865	1,039	–			

Tabela 2

Conținutul de azot total în burse și frunze (1970) (g% s.u. – media a 3 repetiții)

Data	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnificația diferenței *A* – *B*	DL 5%	DL 1%	DL 0,1%
	Burse					
3.IV	1,253	1,326	–			
16.IV	1,141	1,463	o	0,297		
15.V	1,137	1,160	–			
16.VI	0,845	1,024	ooo			0,123
16.VII	0,877	1,037	ooo			0,116
17.VIII	0,848	1,065	ooo			0,089
10.IX	0,925	1,242	ooo			0,123
20.X	1,006	1,202	oo		0,156	
	Frunze					
15.V	3,452	2,883	xxx			0,391
16.VI	2,794	2,582	xxx			0,123
16.VII	2,443	2,200	xx		0,156	
17.VIII	2,192	1,908	–			
10.IX	2,041	1,972	–			

cinile fibroase (I) diferențele nu mai sînt semnificative, sugerează ideea metabolizării și plecării rapide a azotului din rădăcinile fibroase spre cele mai groase (II și III) și o întîrziere probabilă a acestuia în țesuturile ultimelor, de unde va migra continuu către organele aeriene.

Manifestarea, încă din timpul iernii, a rolului activ al rădăcinilor fibroase (I), de absorbție a azotului în vederea aprovizionării plantei ce va purta fructe, arată nevoia prezenței masive a azotului în sol, asigurată prin fertilizare. De aceea, administrarea parțială a îngrășămintelor azotoase, toamna, este absolut necesară pentru asigurarea unei recolte bune în anul următor.

Tabela 3

Conținutul de azot total în burse și frunze (1971) (g%s.u. – media a 3 repetiții)

Data	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnificația diferenței *A* – *B*	DL 5%	DL 1%	DL 0,1%
			Burse			
5.IV	1,627	1,276	xxx			0,247
18.V	1,344	1,026	xxx			0,151
18.VI	1,353	1,058	xx		0,168	
28.VII	1,082	0,875	xx		0,142	
30.VIII	1,186	1,063	—			
23.IX	1,240	1,110	x	0,115		
21.X	1,502	1,346	xx		0,142	
			Frunze			
18.V	2,879	3,324	ooo			0,117
18.VI	2,387	2,709	ooo			0,247
28.VII	2,157	2,482	ooo			0,247
30.VIII	1,887	2,207	ooo			0,117
23.IX	2,005	2,140	—			

Bursele, aceste „pungi de rod", bogate în substanțe de rezervă și generînd noi producțiuni fructifere (2), se diferențiază foarte semnificativ în cazul cînd poartă sau nu fructe (tabelele 2 și 3) : cele cu fructe (*A*) conțin mai puțin azot total decît cele fără fructe (*B*), ele atestînd un rol doar de trecere a acestui element spre fructe, unde este necesar sintezelor proteice în tot timpul dezvoltării lor. În schimb, bursele pomilor B conțin azot mai mult, el consumîndu-se doar pentru dezvoltarea mugurelui florifer și rămînînd ca rezervă pentru dezvoltarea din primăvara viitoare. Analogia datelor anilor 1970 și 1971 atestă verosimilitatea fenomenului.

În privința formelor sub care se găsește combinat azotul, proteinele constituie combinațiile principale care-l conțin. Calculat în procente din azotul total, azotul proteic arată o diferențiere netă a rădăcinilor pomilor *A* și *B* (tabelul 4), și anume, la pomii cu fructe (*A*), în timpul perioadei de vegetație (mai, iulie) rădăcinile fibroase (I), deși au mai mult azot (tabelul 1), au un procent foarte semnificativ mai mic de azot proteic decît pomii fără fructe (*B*), ceea ce sugerează ideea că cea mai mare parte din azot se găsește sub formă transportabilă către organele aeriene. În

octombrie, rădăcinile fibroase nu mai prezintă deosebiri, acestea menţinîndu-se la rădăcinile superioare (II). Din luna ianuarie situaţia se inversează : la pomii ce vor avea fructe în anul respectiv (*B*) procentul de azot proteic este foarte semnificativ mai mare decît la cei fără fructe (*A*), stare ce se menţine şi în luna mai — analog cu anul precedent. La

Tabela 4

Procentul de azot proteic din cantitatea de azot total, în rădăcini (1970–1971)

Data	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnificaţia diferenţei *A*–*B*	DL 5%	DL 1%	DL 0,1%
	I – Ø < 3mm					
13.V. 1970	44,61	62,31	ooo			13,24
21.VII. „	71,18	90,04	ooo			10,56
21.X. „	36,98	37,33	—			
25.I. 1971	77,10	59,06	xxx			10,90
17.V. „	55,17	42,49	xxx			7,55
	II – Ø = 5–10 mm					
13.V. 1970	34,01	38,60	—			
21.VII. „	37,73	78,67	ooo			2,08
21.X. „	21,24	26,07	oo		3,80	
25.I. 1971	46,29	56,87	o	10,50		
17.V. „	39,89	36,21	—			
	III – Ø = 11–20 mm					
13.V. 1970	26,24	32,50	—			
21.VII. „	56,00	78,61	ooo			13,03
21.X. „	39,14	41,11	—			
25.I. 1971	42,34	54,39	ooo			11,18
17.V. „	34,03	28,24	—			

rădăcinile II şi III schimbarea se produce mai lent, ea nemanifestîndu-se în limitele perioadei cercetate, probabil datorită unui procent mai mare de ţesuturi mai puţin active ; dar rămîne de presupus că situaţia va fi analogă celei din anul precedent, aşa cum indică, mai rapid, rădăcinile fibroase (I).

În frunze, procentul de azot proteic prezintă diferenţe foarte mici, total nesemnificative, valorile lui oscilînd între 90 şi 98 % din azotul total.

În ce priveşte bursele, însă, azotul proteic le diferenţiază net pe cele ce poartă fructe (*A*), de celelalte (tabelul 5) : primele,care conţin şi azot total mai puţin, au şi un procent de azot proteic mai mic decît cele fără fructe. Însemnează că şi ţesuturile proprii reţin puţin azot, îl metabolizează mai puţin pentru nevoile lor reduse, lăsîndu-l să treacă, în majoritate, spre fructe. Bursele ce nu poartă fructe (*B*) poartă mugure ce diferenţiază ţesuturi florale, deci un metabolism mult mai complex, cu nevoi diferenţiate, ce reclamă activitatea unor proteine (enzime) noi. Diferenţele dintre bursele A şi B sînt foarte semnificative şi absolut analoge în cei doi ani cercetaţi.

Tabela 5

Procentul de azot proteic din cantitatea de azot total, în burse (1970–1971)

Data	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnificaţia diferenţei *A*-*B*	DL 5%	DL 1%	DL 0,1%
		1970				
3.IV	80,38	91,78	ooo			10,56
16.IV	77,37	80,27	—			
15.V	62,77	77,45	ooo			12,48
16.VI	65,98	80,46	ooo			10,01
16.VII	79,02	88,68	oo		8,96	
17.VIII	83,45	92,56	oo		8,03	
10.IX	86,74	94,38	oo		5,68	
20.X	78,89	76,80	—			
		1971				
5.IV	77,59	68,07	xxx			1,10
18.V	75,17	72,50	—			
18.VI	65,19	56,63	xx		7,39	
28.VII	80,40	65,83	xxx			11,66
30.VIII	81,72	66,20	xxx			11,06
23.IX	77,90	68,63	xx		7,46	
21.X	86,11	81,05	xx		4,51	

Tabela 6

Conţinutul de azot aminic în rădăcini (1970 –1971 (g% s.u. – media a 3 repetiţii)

Data	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnificaţia diferenţei *A*–*B*	DL 5%	DL 1%	DL 0,1%
	I – Ø < 3 mm					
13.V. 1970	0,246	0,147	xxx			0,001
21.VII. ,,	0,124	0,116	—			
21.X. ,,	0,234	0,180	—			
25.I. 1971	0,191	0,255	—			
17.V. ,,	0,128	0,239	ooo			0,103
	II – Ø = 5 – 10 mm					
13.V. 1970	0,395	0,209	xxx			0,002
21.VII. ,,	0,351	0,196	—			
21.X. ,,	0,264	0,232	—			
25.I. 1971	0,338	0,239	—			
17.V. ,,	0,221	0,325	oo		0,092	
	III – Ø = 11 – 20 mm					
13.V. 1970	0,272	0,160	xxx			0,001
21.VII. ,,	0,230	0,183	—			
21.X. ,,	0,191	0,144	—			
25.I. 1971	0,276	0,167	—			
17.V. ,,	0,127	0,248	ooo			0,079

Azotul sub formă aminică (aminoacizi liberi), urmărit în rădăcini (tabela 6), arată diferenţe foarte semnificative, la toate categoriile, numai iarna şi primăvara (ianuarie şi mai), cînd pomii cu fructe îl conţin în cantitate mai mare, el fiind forma uşor transportabilă şi asimilabilă de către ţesuturile organelor aeriene. Existenţa cantităţii sensibil mai mari a acestei forme de azot, încă din ianuarie, în rădăcinile fibroase, atestă activitatea lor intensivă şi — cum am mai spus — necesitatea aplicării diferenţiate a îngrăşămintelor cu azot toamna şi primăvara de timpuriu.

Tabela 7

Conţinutul de azot aminic în burse şi frunze (1970) (g% s.u. — media a 3 repetiţii)

Data	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnificaţia diferenţei *A* — *B*	DL 5%	DL 1%	DL 0,1%
		Burse				
16.IV	0,115	0,150	ooo			0,025
15.V	0,128	0,118	—			
16.VI	0,156	0,117	xxx			0,025
16.VII	0,124	0,091	xxx			0,025
17.VIII	0,047	0,073	ooo			0,025
10.IX	0,070	0,099	oo		0,017	
		Frunze				
15.V	0,060	0,038	xx		0,017	
16.VI	0,057	0,034	x	0,015		
16.VII	0,046	0,035	—			
17.VIII	0,034	0,022	—			
10.IX	0,046	0,033	—			

În frunze, la pomii cu fructe, cantitatea de azot aminic (tabela 7) este semnificativ mai mare numai primăvara (mai şi iunie), cînd metabolismul intens al ţesutului pericarpului în diviziune reclamă un aport susţinut de metaboliţi. Ulterior, diferenţele nu mai sînt semnificative, deşi se menţin ca sens.

Bursele, în schimb, arată schimbări periodice ale conţinutului de azot aminic. În aprilie, înainte de înflorit, bursele purtătoare de muguri floriferi (*A*), în faza de umflare, au rezerve de aminoacizi mult mai mici, aceştia fiind „pompaţi" asiduu în organele florale în plină dezvoltare. Începînd cu sfîrşitul lunii mai şi apoi în iunie — iulie, bursele cu fructe conţin mai mult azot aminic, probabil printr-o intensificare a migrării lui din rădăcini, pînă în august, cînd cantitatea lui scade la o treime. Momentul ar corespunde începutului fazei de încetinire a ritmului creşterii fructelor. În bursele fără fructe (*B*) se găseşte mai puţin azot aminic, datorită, poate, faptului că ţesuturile lor nu reclamă un aport serios, nevoile pentru mugurii florali, care se diferenţiază, nefiind mari, dar şi probabilităţii de a fi stocat în proteine, ca rezerve pentru anul viitor. Dacă ne referim la faptul găsit că bursele cu fructe au mai puţin azot total decît cele fără fructe, iar din acesta şi un procent mai mic de azot proteic, cantitatea mai mare de azot aminic arată rolul foarte important al aminoacizilor, formă sub care se

transportă azotul. Din luna iunie, în bursele cu fructe scade cantitatea de azot aminic şi creşte procentul de azot proteic, ceea ce sugerează fixarea unei părţi din aminoacizi în proteinele ţesuturilor proprii (cantitatea de azot total menţinîndu-se aproape constantă), pînă în luna august.

CONCLUZII

Cantitatea totală de azot şi formele sub care acesta se găseşte combinat în diferitele organe ale plantei deosebesc net pomii ce poartă fructe, de cei lipsiţi de acestea, dar care diferenţiază muguri floriferi pentru recolta viitoare.

Rădăcinile fibroase ale pomilor cu fructe conţin mai mult azot total, mai mult azot aminic şi un procent mai mic de azot proteic. Diferenţa se manifestă iarna şi primăvara, arătînd necesitatea administrării diferenţiate a îngrăşămintelor cu azot, toamna şi primăvara de timpuriu.

Frunzele pomilor cu fructe conţin mai mult azot total şi aminic, fără să manifeste diferenţe semnificative în privinţa procentului de azot proteic : creşterea şi dezvoltarea fructelor reclamă un aport intens de metaboliţi, născuţi din metabolismul intens al frunzelor.

Bursele, formaţiunile pe care se formează mugurii floriferi ai recoltei viitoare, conţin mai mult azot total cînd nu poartă fructe, mai puţin azot aminic şi un procent mai mare de azot proteic din total

Prezentat la redacţie la 23 martie 1974

Institutul de cercetări pentru pomicultură
Staţiunea experimemntală pomicolă
Voineşti — Dîmboviţa

BIOCHEMICAL ASPECTS OF FLORAL BUD DIFFERENTIATION IN APPLE TREES. I. THE CONTENT OF SOME FORMS OF NITROGEN IN THE ORGANS OF APPLE TREES WITH OR WITHOUT FRUITS

SUMMARY

Studies were carried out during 1970 and 1971 on apple trees of the native cultivar Creţesc, manifesting a typical fruiting periodicity, and determinations were made of the total, protein and aminic nitrogen contents in the roots, leaves and pouches.

In fruit-bearing trees, in which the flower buds are not differentiating for further growth, the contents of total and aminic nitrogen is higher and that of protein nitrogen lower in the fibrous roots during winter — when they resume activity — and spring. In the thicker roots (ø = = 5 — 10 and 11—12 mm) the differences also persist during summer.

The leaves of fruit-bearing trees also contain higher amounts of total and aminic nitrogen, but no significant differenees as to the protein nitrogen were established.

In the pouches, on which the floral buds are differentiating in the apple trees without fruits, the content of total and protein nitrogen is higher and that of aminic nitrogen is lower than in the fruit-bearing trees.

The nitrogen-absorbing activity of the roots initiated already in winter accounts for the necessity of the application of a differentiated nitrogen fertilization during autumn and early in spring.

BIBLIOGRAFIE

1. W. I. Nickerson, S. Bartnicki-Garcia, Ann. Rev. Plant physiol., **15**, 327 (1964).
2. N. Constantinescu, A. Negrilă, N. Ghena, Gr. Mihăescu, *Pomicultura*, Ed. Agro-Silvică, Bucureşti, 1967.
3. Ilarie Isac, *Influenţa unor sisteme de coroană asupra creşterii şi rodirii la cîteva soiuri de măr altoite pe Dusen.* Teză de doctorat, IANB, Bucureşti, 1970.
4. R. Schumacher, Obst-u. Weinbau, **37**, 180 (1968).
5. R. Schumacher, Obst-u. Weinbau, **38**, 32 (1969).
6. M. J. Bielinska, Prace Inst. Sadov. Skiern., **III**, 231 (1956).
7. W. Klossowski, Acta Acad. Pol. Sci., Ser. Biol., **15**, 281 (1967).
8. L. Wlodek, M. Bielinska-Czarcecka, Prace Inst. Sadow. Skiern., **VII**, 29 (1963).
9. G. W. Snedecor, *Metode statistice în cercetările de agricultură şi biologie.* Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1968.

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 1, 13–16 (1975)

CONTRIBUȚIE LA STUDIUL AMINOACIZILOR LIBERI DIN ALGE

VIORICA MOGA

Rezumat. — Aminoacizii liberi extrași cu ajutorul rășinii schimbătoare de ioni Merck 1 (cationit) au fost separați prin cromatografie ascendentă pe hîrtie, utilizînd drept soluție de irigare un amestec de N butanol-acid formic-apă distilată-alcool etilic, în proporție de 40—10—40—2. S-au identificat din alga *Enteromorpha linza* un număr de 18 aminoacizi liberi, iar din alga *Enteromorpha intestinalis* 13 aminoacizi liberi. Absența histidinei, lizinei, asparaginei, metioninei și tirozinei din alga *Enteromorpha intestinalis* indică alga *Enteromorpha linza* ca mai eficientă din punct de vedere biochimic în cazul unei eventuale utilizări ca sursă de hrană. În ambele specii predomină din punct de vedere cantitativ acidul glutamic, treonina, glicina și acidul aspartic.

Sînt mai bine de 25 ani de cînd Harold Milner și Herman Spoehr au sugerat că alegele unicelulare ar putea servi ca sursă de hrană pentru populația globului. Ideea cultivării algelor în scopuri alimentare și furajere a fost enunțată de R.Hardner și H. von Witsch în anul 1942. [1,2].

La algele marine și de apă dulce, studiul aminoacizilor liberi a fost pînă nu de mult doar sporadic. Rezultatele obținute în acest domeniu de către Lewis și Gonzalves, în perioada 1959—1964, au permis lărgirea sferei de cercetare. Studii și determinări de aminoacizi liberi s-au efectuat atît pe alge unicelulare cît și pe thalophyte, constatîndu-se că setul de aminoacizi liberi întîlniți în alge este compus din aminoacizi similari cu aceia din plantele cu flori [3,4].

În țara noastră, determinări de aminoacizi liberi au fost efectuate de Sălăgeanu și Galan pe specii din alga verde *Chlamydomonas intermedia* și alga albastră *Oscilatoria amoena*. În alga verde *Chlamydomonas* intermedia au fost identificați următorii aminoacizi liberi: asparagină, acid aspartic, acid glutamic, alanină, treonină, acid aminobutiric, valină, fenilalanină și izoleucină. Din alga *Oscilatoria amoena* s-au separat în cantități mari asparagină, acid aspartic, acid glutamic, alanină, valină, izoleucină, iar în cantități foarte mici acid aminobutiric, treonină, fenilalanină [5].

În cele ce urmează vom expune rezultatele cercetărilor personale care, au vizat conținutul comparativ în aminoacizi liberi din alga de apă dulce *Enteromorpha intestinalis* (L) Link, colectată din apa băilor de la Someșeni (jud. Cluj), și din alga marină *Enteromorpha linza* (L) J. Ag, colectată de pe litoralul românesc al Mării Negre (Agigea).

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul recoltat a fost conservat prin uscare rapidă, în termostat, la 35°C[6]. Determinarea aminoacizilor liberi s-a făcut prin metoda cromatografiei pe hîrtie [7]. Aminoacizii liberi extrași cu ajutorul rășinei

schimbătoare de ioni Merck 1 cationit au fost separaţi prin cromatografie ascendentă pe hîrtie, utilizîndu-se ca soluţie de irigare un amestec de N butanol-acid formic-apă distilată-alcool etilic în proporţie 40 —10 — 40 —2.

S-a folosit următoarea tehnică de lucru : probe conţinînd 200 mg algă uscată se omogenizează cu apă distilată acidulată cu HCl, la un omogenizator Potter de sticlă. Proteinele precipitate cu acetonă clorhidrică (1% în HCl) se centrifughează la 3 000 ture/min. timp de 25 minute. Supernatantul obţinut se trece într-un erlenmayer, la care se adaugă supernatantul centrifugărilor repetate. Aminoacizii fixaţi pe răşina schimbătoare de ioni Merck 1 cationit sînt eluaţi de pe aceasta cu 50 ml soluţie NH_4OH 1,5 N. Soluţia se evaporă, iar reziduul se dizolvă în 0,5 ml apă distilată şi se microfiltrează. Din această soluţie se aplică pe cromatogramă o cantitate corespunzătoare la 4 mg substanţă uscată de algă. Se folosesc drept linie de strat careuri de 5 cm, după metoda semisuprapunerii soluţiei standard cu proba în lucru [8]. Cromatogramele se usucă, se trec în vasul cu soluţia de saturaţie, apoi se introduce din pîlnia de separare soluţia de irigare. Irigarea ţine 12 —14 ore, după care cromatogramele se usucă şi se developează cu ninhidrină 0,1%.

Pentru fiecare din cele două specii de alge amintite s-au efectuat cîte zece determinări.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Tabelă

Compoziţia comparativă în aminoacizi liberi a două specii de alge aparţinînd aceluiaşi gen, dar din medii de viaţă diferite

Nr. crt.	Aminoacizi liberi	ALGA	
		Ent. linza	Ent. intestinalis
1	Leucina	++	++
2	Fenialanina	urme	urme
3	Valina	++	+
4	Metionina	+	—
5	Tirozina	urme	—
6	Alanina	urme	+
7	Prolina	urme	urme
8	Acid glutamic	+++	++
9	Treonina	+++	+++
10	Serina	++	++
11	Glicina	++±	++
12	Triptofan	0	0
13	Arginina	++	+
14	Asparagina	+	—
15	Acid asparatic	++	+++
16	Cisteina Cistina	urme	++
17	Lizina	+	—
18	Histidina	+	—

Utilizînd metoda mai sus citată, am identificat la *Enteromorpha intestinalis* un număr de 13 aminoacizi liberi, iar la *Enteromorpha linza* 18 aminoacizi liberi, trecuţi în tabel. Migrarea aminoacizilor pe cromatogramă şi identificarea lor în funcţie de R_f se poate observa în figurile 1 şi 2.

Din analiza rezultatelor obţinute reiese că cele două specii de alge aparţinînd aceluiaşi gen (Enteromorpha), se deosebesc în ceea ce priveşte conţinutul în aminoacizi liberi atît din punct de vedere cantitativ cît şi calitativ.

Alga *Enteromorpha linza* are un conţinut mai ridicat în aminoacizi liberi decît *Enteromorpha intestinalis*, din care lipsesc lizina, histidina, tirozina, metionina şi asparagina. La ambele specii conţinutul în prolină şi fenilalanină este foarte scăzut, predominînd din

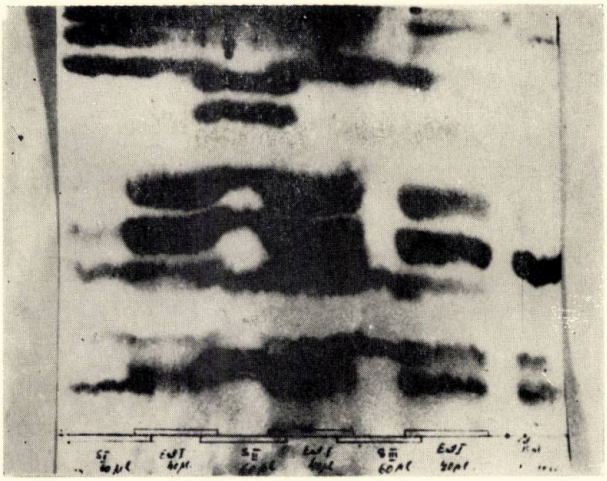


Fig. 1 — Cromatografia aminoacizilor liberi din *Enteromorpha intestinalis* (Ent.I).

S_I — standard I ce conține leucină, fenilalanină, valină, treonină, glicină, asparagină și cistină. S_{II} — standard II ce conține metionină, tirozină, alanină, acid glutamic, serină, lizină și histidină. S_{III} — standard III ce conține triptofan, arginină și acid aspartic.

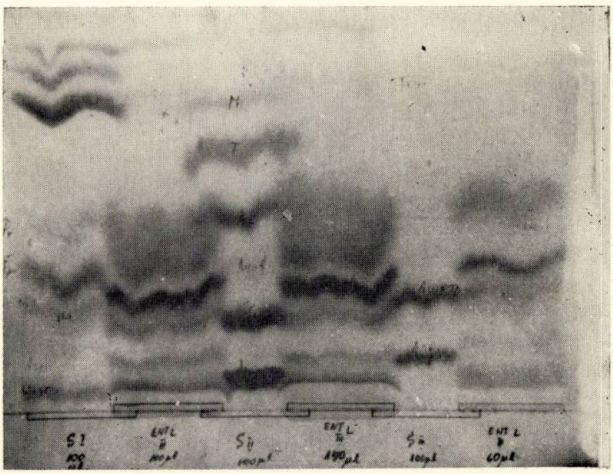


Fig. 2. — Cromatografia aminoacizilor liberi din *Enteromorpha linza* (Ent.L.) Aceeași legendă ca la figura 1.

punct de vedere cantitativ acidul glutamic şi treonina, urmate de acidul aspartic, leucină, valină, serină şi glicină. Subliniem faptul că triptofanul nu a fost identificat, deoarece s-a lucrat în mediu acid, în care el se distruge. Prezenţa triptofanului a fost pusă în evidenţă de către cercetători japonezi [9] la *Enteromorpha linza*, dar într-o cantitate foarte redusă. Alga marină *Enteromorpha linza* are din punct de vedere calitativ acelaşi conţinut în aminoacizi liberi ca şi algele *Ulva lactuca*, *Ulva linza*, *Lesonia nigrescens*, *Porphyra columbina* [10].

S-a pus problema utilizării algelor ca o eventuală sursă de hrană pentru animale şi pentru om. Deoarece organismul animal nu poate sintetiza direct compuşii aparţinînd grupei aminoacizilor ciclici (fenilalanină, triptofan, histidină), aceştia trebuie să fie introduşi în organism pe cale alimentară. Identificarea prezenţei lor în alge simplifică mult această problemă.

Prezenţa metioninei în alga *Enteromorpha linza* este foarte importantă, deoarece ea este un aminoacid esenţial şi reprezintă agentul de metilare al organismului.

Lizina, histidina şi arginina, aminoacizi cu 6 atomi de C în moleculă, care formează aşa-numita fracţiune de baze hexonice a hidrolizatelor proteice, aflîndu-se în cantităţi mai mari în alga *Enteromorpha linza*, o indică pe aceasta ca net superioară din punct de vedere biochimic algei *Enteromorpha intestinalis*.

CONCLUZII

Din determinările efectuate de noi, cît şi din literatura de specialitate, rezultă că algele marine au atît din punct de vedere calitativ cît şi cantitativ un conţinut mai ridicat în aminoacizi liberi decît algele de apă dulce. De aceea, dacă se pune problema utilizării algelor ca o eventuală sursă de hrană pentru animale şi pentru om, cele mai indicate ar fi algele marine.

O altă concluzie se referă la faptul că aminoacizii liberi din alge, determinaţi cantitativ şi calitativ, pot fi un test biochimic cu utilizare în sistematica vegetală.

Prezentat la redacţie
la 12 februarie 1974

Spitalul judeţean
Alba-Iulia

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF FREE AMINO ACIDS FROM ALGAS

SUMMARY

Free amino acids extracted with the help of Merck 1 ion exchange resin, were separated through an ascending chromatography on paper using a mixture of *N* butanol : formic acid : distilled water : ethylic alcohol (40 : 10 : 40 : 2) as irrigation solution. Eighteen free amino acids from *Enteromorpha linza* and 13 free amino acids from *Enteromorpha intes-*

tinalis have been identified. The absence of histidine, lysine, asparagine, methionine and thyrosine from *Enteromorpha intestinalis* points *Enteromorpha linza* more efficient, from the biochemical point of view, as a possible source of food.

BIBLIOGRAFIE

1. D. Mircea, V. Blazena, Natura, august, 1968.
2. W. R. Krauss, Amer. J. Bot., **49**, 425 (1962).
3. E. J. Lewis, E. A. Gonzalves, Ann. Bot., **26**, 317 (1962).
4. A. Hattori, J. Biol. Chem., **233**, 57 (1958).
5. N. Sălăgeanu, G. F. Galan, St. cerc. biol., Seria bot., **20**, 141 (1968).
6. S. G. Willeret, Bull. Soc. Sci. Bret., **41**, 289 (1966) — (1967).
7. O. V. Zalenski, T. A, Glagoleva, Fiziol. Rast., **12**, 1081 (1965).
8. V. Kovaks, *Unele aspecte ale metabolismului metioninei sub influența razelor X*, Teză de doctorat, Cluj, 1968.
9. M. Takaghi, S. Nakamura, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **30**, 284 (1964).
10. G. F. Silva, P. W. Quilhot, Bot. Marina, **8**, 244 (1965).

ST. CERC. BIOCHIM. 18. 1. 17–21 (1975)

ACUMULAREA AMINOACIZILOR ÎN MEDIUL DE CULTURĂ AL UNOR SPECII DE LEVURI

LIDIA POPA

Rezumat — S-a urmărit acumularea aminoacizilor în mediul de cultură a 9 specii şi tulpini de levuri, atît la începutul perioadei staţionare de dezvoltare, cît şi la sfîrşitul dezvoltării.
S-a constatat că alanina şi treonina apar în mediul de cultură al speciilor de levuri testate, atît la începutul perioadei staţionare, cît şi la sfîrşitul dezvoltării. Acizii glutamic şi aspartic predomină la începutul perioadei staţionare. Fenilalanina, leucina şi izoleucina apar numai la sfîrşitul dezvoltării, dar în cantitate mică.

Studiul biosintezei microbiene a aminoacizilor a căpătat în ultima vreme tot mai multă importanţă, datorită numeroaselor lor utilizări în medicină, industria alimentară, zootehnie (1).

Interesează în primul rînd obţinerea aminoacizilor esenţiali, indispensabili în nutriţia omului şi animalelor, ca : lizină, valină, treonină, metionină, triptofan, fenilalanină, leucină, izoleucină, dar şi a unor aminoacizi neesenţiali, ca acidul glutamic folosit mult în medicină şi în industria alimentară (2).

Producţia microbiană de aminoacizi are un avantaj precis asupra sintezei chimice, fiind mai uşoară şi mai ieftină, iar aminoacizii obţinuţi pe această cale aparţinînd exclusiv formei biologic active L (1), (3).

Cercetările asupra biosintezei microbiene a aminoacizilor făcute sistematic, începînd din 1956, în Japonia, de către Kinoshita şi colaboratorii săi au arătat că majoritatea grupelor de microorganisme sînt capabile să producă în mediul de cultură, mai ales la sfîrşitul perioadei exponenţiale, mici cantităţi de aminoacizi, între care predomină : acidul glutamic, acidul aspartic, alanina, glicina, serina, valina, fenilalanina, leucina, izoleucina (3), (4).

În prezenta lucrare, ne-am propus să cercetăm formarea aminoacizilor în mediul de cultură al unor specii de levuri, mai puţin studiate din acest punct de vedere.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat cu următoarele specii şi tulpini de drojdii din colecţia laboratorului de microbiologie al facultăţii de Biologie din Bucureşti : *Saccharomyces cerevisiae I.F.O. 0044* şi *Saccharomyces cerevisiae C*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Hansenula subpelliculosa A77*, *Pichia membranofaciens* C_1, *Torulopsis glutinis pringsheim*, *Candida utilis C 14*, *Candida lipolytica C 62*.

Ca mediu de experienţă pentru testarea producerii de aminoacizi s-a folosit mediul lui Thorne (5), de compoziţia următoare: glucoză — 5,0 g; KH_2PO_4 —0,2 g; $MgSO_4.7H_2O$ —0,1 g; $CaSO_4.2H_2O$ —0,02 g; $FeSO_4.7H_2O$ —0,001 g; sursă de azot echivalentă la 0,5 g N (s-a folosit $(NH_4)_2SO_4$); apă distilată —100 ml; pH = 5,0—5,2. S-a repartizat cîte 100 ml în pahare Erlenmeyer de 500 ml capacitate.

Ca mediu pentru inoculum s-a folosit tot mediul Thorne modificat precum urmează: glucoză —2,0 g; $(NH_4)_2SO_4$ —0,2g; KH_2PO_4 —0,1 g; $MgSO_4.7H_2O$ —0,05 g; $CaSO_4.2H_2O$ —0,02 g; $FeSO_4.7H_2O$ —0,001 g; apă distilată —100 ml; pH = 5,0—5,2. S-a repartizat cîte 10 ml în pahare Erlenmeyer de 50 ml capacitate.

Drojdiile luate în studiu au fost însămînţate pe mediul pentru inoculum şi incubate la 28°C, timp de 24 h. Însămînţarea mediului pentru experienţă s-a făcut cu 4 ml inoculum de 24 h. Cultivarea s-a făcut la 28°C, sub agitare continuă într-un Vibroterm. Zilnic s-a determinat pH-ul şi s-a ajustat la 5,0—5,2 cu NaOH —10% steril.

Pentru a vedea dacă există deosebiri calitative între aminoacizii care apar s-au făcut două experienţe. În prima experienţă analiza lichidului de cultură s-a efectuat la sfîrşitul dezvoltării, cînd pH-ul a rămas neschimbat; în a doua, la 3 zile de la însămînţare, adică la sfîrşitul perioadei exponenţiale şi începutul fazei staţionare de dezvoltare.

Evidenţierea aminoacizilor s-a făcut prin cromatografie pe hîrtie, după prealabila centrifugare a mediului la 3 000 de ture timp de 30 de minute, pentru îndepărtarea celulelor de drojdie. În prima experienţă, prelucrarea supernatantului obţinut s-a făcut cu acetonă acidă (acetonă anhidră + 1% HCl concentrat) (6). În acest scop, 5 ml supernatant se evaporă la sec în termostat la 37°C. Se adaugă apoi, pentru 1 ml supernatant, 8 ml acetonă acidă, se agită, se lasă să stea 2 h şi se centrifughează. Soluţia se evaporă la sec, la termostat, la 37°C, iar reziduul se reia cu alcool izopropilic 10% în proporţie de: 0,1 ml alcool izopropilic 10% la 1 ml probă iniţială.

În experienţa a doua, prelucrarea supernatantului s-a făcut prin trecere pe coloană de Zerolit 3RC 10,4—5% DVC, 52—100 mesh, eluarea aminoacizilor cu amoniac 5%, evaporare la sec pe baia de apă şi reluare cu alcool izopropilic 10% în aceeaşi proporţie.

S-a folosit hîrtie Whatman nr.1, pe care s-au aplicat cîte 0,015—0,02ml din fiecare probă. Aceeaşi cantitate s-a aplicat şi din aminoacizii care au servit ca martor. Irigarea s-a făcut de 3 ori, prima dată cu butanol: acid acetic: apă (4:1:5), iar a doua şi a treia oară cu butanol: acid acetic: apă (40:15:5). Cromatograma uscată la temperatura camerei a fost developată prin stropire cu o soluţie 0,3% de ninhidrină în acetonă, sau alcool etilic, care conţinea 1% acid acetic. După evaporarea acetonei, sau alcoolului etilic, cromatograma s-a introdus într-o etuvă la 65°C, 30 de minute, şi apoi s-a lăsat 24 h la întuneric, la temperatura camerei (7, 8).

În afară de evidenţierea cromatografică a aminoacizilor formaţi, în prima experienţă s-au mai făcut următoarele determinări: examenul

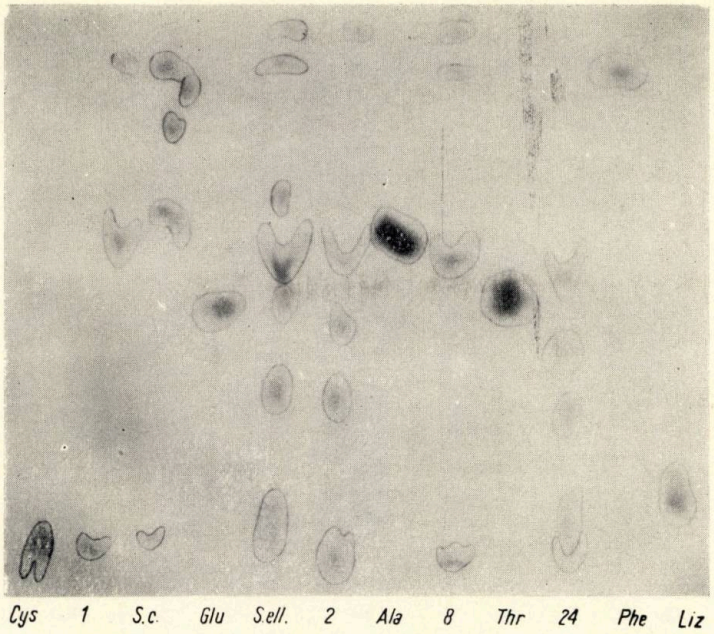


Fig. 1. — Cromatograma aminoacizilor din mediul de cultură a unor specii de levuri, la sfîrşitul dezvoltării (experienţa I).

Legendă : 1 = Saccharomyces cerevisiae I. F. O. 0044 ; S. c. = Saccharomyces cerevisiae C ; S. ell = Saccharomyces ellipsoideus ; 2 = Hansenula subpelliculosa A 77 ; 8 — Torulopsis glutinis pringsheim ; 24 = Candida utilis C_{14}.

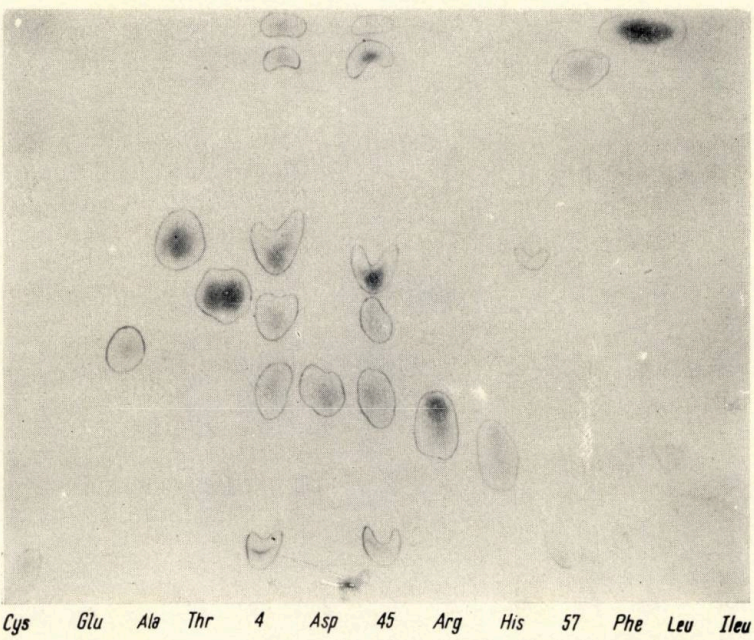


Fig. 2.—Cromatograma aminoacizilor din mediul de cultură a unor specii de levuri, la sfîrşitul dezvoltării (experienţa I).

Legendă : 4 = Pichia membranofaciens C_1 ; 45 = Candida robusta C_{38} ; 57 = Candida lipolytica C_{62}.

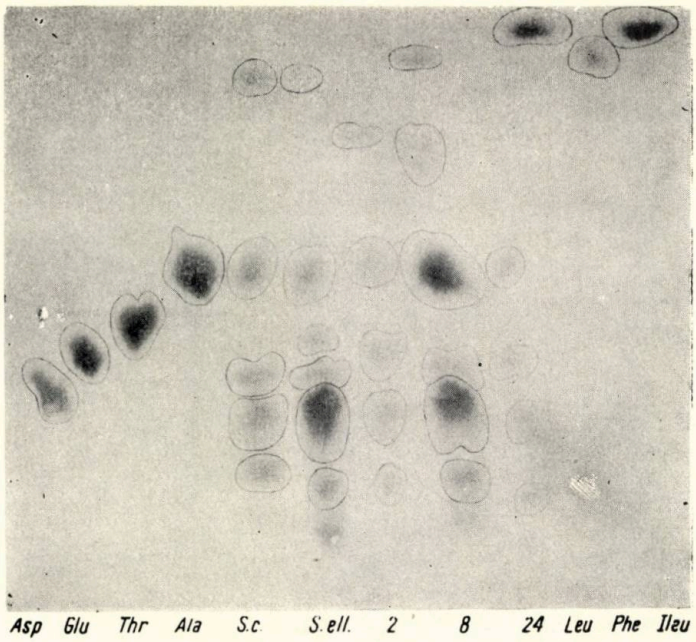


Fig. 3.— Cromatograma aminoacizilor din mediul de cultură a unor specii de levuri, la începutul perioadei staţionare de dezvoltare (experienţa a II-a).

Legenda: S. c. = Saccharomyces cerevisiae C; S. ell = Saccharomyces ellipsoideus; 2 = Hansenula subpelliculosa A 77; 8 = Torulopsis glutinis pringsheim; 24 = Candida utilis C_{14}.

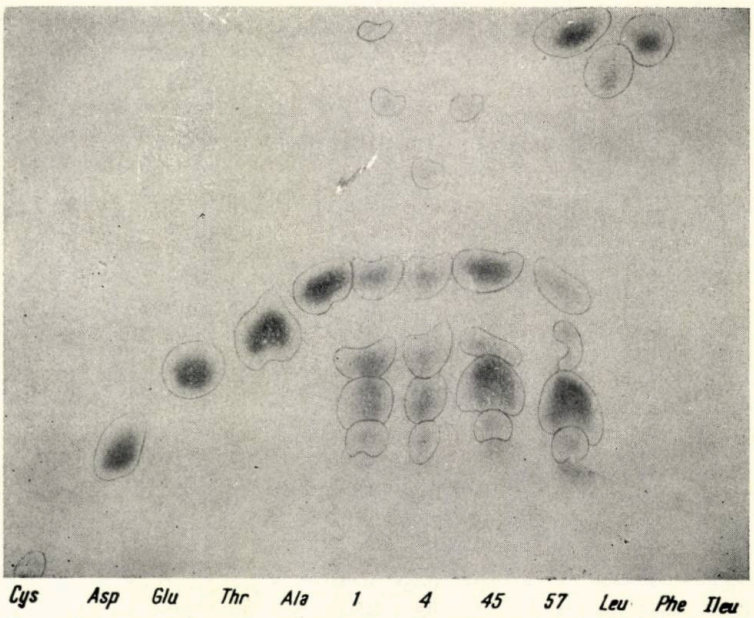


Fig. 4.— Cromatograma aminoacizilor din mediul de cultură a unor specii de levuri, la începutul perioadei staţionare de dezvoltare (experienţa a II-a).

Legenda: 1 = Saccharomyces cerevisiae I. F. O. 0044; 4 = Pichia membranofaciens C_1; 45 = Candida robusta C_{38}; 57 = Candida lipolytica C_{62}.

microscopic al levurilor testate, pe preparate între lamă şi lamelă, atît din inoculum, cît şi la sfîrşitul experienţei; masa celulară, nefelometric, la un FEK 56 M; în supernatant, zahărul rămas neconsumat, după metoda Bertrand (9), modificată de Macovschi şi Sarmanioti (10).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Examenul microscopic efectuat la sfîrşitul experienţei nu a arătat nici o modificare morfologică la drojdiile luate în studiu, faţă de aspectul din inoculum.

Aminoacizii formaţi în mediul de cultură sînt redaţi cromatografic în fig. 1 şi 2 (exp. I-a) şi 3 şi 4 (exp. a II-a). Din observarea acestora se constată următoarele:

— la toate speciile de levuri testate, cisteina apare în cantitate foarte mică şi numai la sfîrşitul perioadei de dezvoltare;

— dintre aminoacizii care se întîlnesc în mediul de cultură, la majoritatea speciilor de levuri testate, atît la începutul perioadei staţionare, cît şi la sfîrşitul dezvoltării, se remarcă: alanina, acidul glutamic, acidul aspartic, treonina. Cea mai frecventă este alanina, care se întîlneşte la toate speciile testate şi în cantitate mare. În cantitate destul de mare se întîlnesc şi acizii glutamic şi aspartic;

— unii aminoacizi sînt mai frecvenţi la începutul perioadei staţionare decît la sfîrşitul dezvoltării. Aşa sînt acizii glutamic şi aspartic, care la începutul perioadei staţionare se întîlnesc la toate speciile, pe cînd la sfîrşitul dezvoltării se întîlnesc numai la 3, respectiv 5 specii;

— alţi aminoacizi apar de preferinţă la sfîrşitul dezvoltării, ca: fenilalanina, leucina, izoleucina:

— remarcăm prezenţa la unele specii a unui aminoacid mai rar, treonina, care la *Pichia membranofaciens* este în cantitate destul de mare.

Facem precizarea că aprecierile privind cantitatea de aminoacizi, sînt făcute pe baza dimensiunii şi intensităţii culorii petelor de pe cromatograme şi nu pe baza determinărilor cantitative.

Din compararea rezultatelor obţinute la cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor şi a celor obţinute la determinările de masă celulară şi zahăr consumat (tabela 1) se constată că nu există o corelaţie între masa celulară formată, cantitatea de zahăr consumat şi cantitatea de aminoacizi acumulată în mediu. *Pichia membranofaciens* de exemplu, care formează o masă celulară mare (27,9%) şi consumă tot zahărul din mediu, acumulează şi o cantitate mai mare de aminoacizi în mediu. Alte specii, ca *Hansenula subpelliculosa* şi *Candida utilis*, care de asemenea formează mase celulare mari (27,6% şi respectiv 36%) şi consumă tot zahărul, acumulează cantităţi mici de aminoacizi în mediu. În sfîrşit, există şi specii, ca *Saccharomyces ellipsoideus*, *Torulopsis glutinis* şi *Candida robusta*, care deşi formează mase celulare mici (90%, 88,8% şi 74,8%), iar unele dintre ele nici nu consumă tot zahărul, acumulează în schimb o cantitate destul de mare de aminoacizi în mediu.

Tabela 1

Variația cantității de zahăr consumat și a masei celulare obținute

Specia de drojdie	Zahăr cantitativ (g%)		Masă celulară (nefelometric) dil. 1/100*
	neconsumat	consumat	
Saccharomyces cerevisiae I. F. O. 0044	4,616	0,384	98,4 %
Saccharomyces cerevisiae C	4,261	0,739	97,8 %
Saccharomyces ellipsoideus	—	5,000	74,8 %
Hansenula subpelliculosa A 77	—	5,000	27,6 %
Pichia membranofaciens C_1	—	5,000	27,9 %
Torulopsis glutinis pringsheim	4,319	0,681	88,8 %
Candida utilis C 14	—	5,000	36,0 %
Candida robusta C_{38}	—	5,000	90,0 %
Candida lipolytica C_{62}	3,839	1,161	76,0 %

* rezultatele sînt exprimate în procente lumină transmisă

CONCLUZII

1. Acumularea aminoacizilor în mediul de cultură al levurilor testare are loc în proporție mai mare la începutul perioadei staționare de dezvoltare, decît la sfîrșitul dezvoltării. Ea nu depinde nici de cantitatea de zahăr consumat, nici de masa celulară formată.

2. Dintre aminoacizii care predomină în mediul de cultură se remarcă : alanina, acidul glutamic, acidul aspartic ; aceștia sînt în cantitate destul de mare, în special alanina.

3. La unele specii apare un aminoacid mai rar întîlnit, treonina.

4. În cantitate mică, dar în mod constant se întîlnesc și aminoacizii : fenilalanina, leucina, izoleucina.

5. În ceea ce privește perioada de apariție se remarcă următoarele : alanina și treonina apar atît la începutul perioadei staționare, cît și la sfîrșitul dezvoltării ; acidul glutamic și acidul aspartic predomină la începutul perioadei staționare ; fenilalanina, leucina și izoleucina apar numai la sfîrșitul dezvoltării.

Prezentat la redacție la 30 aprilie 1974

Catedra de biologie vegetală, microbiologie și genetică. Laboratorul de microbiologie Facultatea de biologie — București

THE ACCUMULATION OF AMINO ACIDS IN THE CULTURE MEDIUM OF SOME YEAST SPECIES

SUMMARY

The accumulation of amino acids in the culture medium of 9 yeast species and strains was followed both at the beginning of the stationary period and at the end of growing.

Alanine and threonine were detected in the culture medium of the tested yeasts both at the beginning of the stationary phase and at the end of the growing. Glutamic and aspartic acids were preponderent at the beginning of the stationary phase. Phenylalanine, leucine and isoleucine appeared at the end of the growing, but in small quantity.

BIBLIOGRAFIE

1. E. L. Ruban, Izvest. Akad. Nauk SSSR, Seria biologhiceskaia, *3*, 370 (1962).
2. N. A. Krasilnicov, Usp. sovrem. biol., **52**, 149 (1961).
3. S. Kinoshita, Adv. in Appl. Microbiol., **1**, 201 (1959).
4. P. Simon, R. Meunier, *Microbiologie industrielle et génie biochimique*, Masson et C-ie Editeurs, Paris, 1970, p. 435.
5. F. Reindel, W. Hoppe, Chem. Berichte, **85**, 716 (1952).
6. I. M. Hais, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*, Editura tehnică, Bucureşti, 1960, p. 409 (traducere din limba cehă).
7. N. A. Golovkin, O. S. Sagan, A. A. Vasiliev, E. M. Milţina, Prikl. biohim. i mikrobiol., **3**, 184 (1967).
8. G. N. Zaiţeva, A. N. Belozerski, Mikrobiologhiia, **26**, 533 (1957).
9. G. Bertrand, P. Thomas, *Guide pour les manipulations de Chimie Biologique*, H. Dunod et E. Pinat Éditeurs, Ed. a II-a, Paris, 1913, p. 85.
10. E. Macovschi, C. Sarmanioti, St. cerc. biochim., **1**, 271 (1958).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 1, 23–21 [1975]

ROTAȚIA SPECIFICĂ A SOLUȚIILOR ȘI GELURILOR DE GELATINĂ

FLOARE ROTTENBERG

Rezumat. — Modificarea formei macromoleculei de gelatină, la trecerea din soluție în gel, este cauza modificării unghiului de rotație al planului luminii polarizate, deci și a rotației specifice.
Modificarea unghiului de rotație (și a rotației specifice) se menține și în condiții de temperatură constantă, precum și în prezența *D*-glucozei și *D*-fructozei.

În gelatină există o cantitate apreciabilă de elemente structurale de tipul conformațional poli-*L*-prolină II, remanente în catena peptitidă a acesteia, fapt constatat și de Harrington [1], precum și de alți cercetători. Datorită acestora, gelatina are o rotație specifică levogiră destul de mare.

La trecerea gelatinei din soluție în gel s-a remarcat o modificare semnificativă a rotației specifice [1] — [5]. S-a încercat să se explice această modificare prin fenomenul de mutarotație sau prin scăderea temperaturii la gelificarea soluției.

Hippel, Harrington și Veis [6] au arătat că rotația specifică a gelului de gelatină este mai mare decît a soluției, datorită trecerii de la forma liniară (soluție) la cea de helix (gel).

Ramachandran [7], prin difracția cu radiații *X* și Bradbury [4] prin spectroscopie în *IR*, au demonstrat că macromolecula de gelatină în stare de gel are conformația asemănătoare cu a colagenului.

În lucrarea de față s-a determinat unghiul de rotație al planului luminii polarizate, după ce s-a ajuns la o stabilitate mutarotațională, s-a calculat rotația specifică la soluții și geluri de gelatină, la temperatură constantă (25°C) — solvent apa și s-au făcut aceleași determinări utilizînd ca solvenți soluții izotonice de *D*-glucoză și *D*-fructoză, în scopul de a verifica dacă și în aceste condiții se menține diferența, valoric mare, dintre rotația specifică a gelurilor și aceea a soluțiilor.

MATERIAL ȘI METODĂ

La gelatina comercială (M = 60.800) am măsurat, cu un polarimetru tip SM, unghiul de rotație al planului luminii polarizate (α) în funcție de :

a) Concentrația gelatinei : $\alpha = f(c)$ de la $c = 0{,}02 - 0{,}06$ g/ml (pentru soluții și geluri), solvent apa.

b) Activitatea optică a soluțiilor izotonice de glucoză și fructoză.

Cele două substanțe optic active alcătuiesc cu gelatina un sistem. La glucoză (M = 198), concentrația pentru soluția izotonică este de

0,05961 g/ml, $\alpha_{exp} = 6°$ iar $\alpha_{calculat} = 5°$, 954. La fructoză (M = 180), $c_{izo} = 0{,}0549$ g/ml, $\alpha_{exp} = -9°{,}51$ iar cel calculat de 9°,592.

Şi în acest experiment am păstrat aceeaşi concentraţie a gelatinei.

Rotaţia specifică am calculat-o pentru toate valorile experimentale ale lui α cu relaţia :

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha}{cl} \tag{1}$$

unde : c = concentraţia gelatinei în apă (a) şi
c = suma concentraţiilor gelatină + glucoză sau gelatină + fructoză (b).
l = lungimea tubului polarimetric.

Valorile experimentale ale lui α s-au comparat cu cele calculate după legea lui Biot :

$$\alpha = [c\,[\alpha]_D^{25} + c_1\,[\alpha_1]_D^{25}]\,l, \tag{2}$$

unde : $[\alpha]_D^{25}$ = rotaţia specifică a soluţiei de gelatină = — 122°,01
$[\alpha_1]_D^{25}$ = rotaţia specifică a glucozei = 52°,58 sau rotaţia specifică a fructozei = — 92°,498 (la temperatura de 25°C)
c_1 = concentraţia glucozei sau a fructozei

Determinările au fost efectuate la aceeaşi lungime de undă a sursei, 5893 Å. La gelatină şi glucoză s-a măsurat α la minimum 12 ore de la prepararea soluţiilor, după ce s-a stabilit un echilibru al fenomenului de mutarotaţie.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În figura 1 sînt reprezentate valorile lui $\alpha = f(c)$, atît pentru soluţii cît şi pentru gelurile de gelatină. Valoric, între α_{sol} şi α_{gel} există o diferenţă de 2° — 2°, 2 : $\alpha_{gel} > \alpha_{sol}$ pentru aceeaşi concentraţie a gelatinei.

La gel, mobilitatea moleculei de gelatină este redusă, se formează o reţea macromoleculară tridimensională, în ochiurile căreia se găseşte o soluţie diluată de gelatină. Gelificarea modifică proprietăţile fizice ale soluţiei de gelatină, cum ar fi : elasticitatea, vîscozitatea, rezistenţa mecanică etc. [8] — [11].

Modificarea unghiului de rotaţie arată că structura moleculei de gelatină e diferită la gel, faţă de soluţie (de aceeaşi concentraţie).

Între valorile lui α_{exp} şi $\alpha_{calculat}$ (cu formula 2) nu există diferenţe semnificative (figura 1).

Cu valorile unghiului α_{exp} pentru soluţia de gelatină am calculat rotaţia specifică, care este — 122°,01 (conform definiţiei).

Cohen [2] a obţinut pentru proteine denaturate şi gelatine valori ale rotaţiei specifice cuprinse între — 80° şi — 120°.

Comparînd valorile rotaţiei specifice ale gelurilor (fig. 2) cu acelea ale soluţiilor de gelatină (de aceeaşi concentraţie), se remarcă o creştere semnificativă a valorilor $[\alpha]_{D\,gel}^{25}$, de exemplu pentru $c = 0{,}02$ g/ml $[\alpha]_{D\,gel}^{25} = -184°{,}21$, iar rotaţia specifică a soluţiei este = — 126°31,

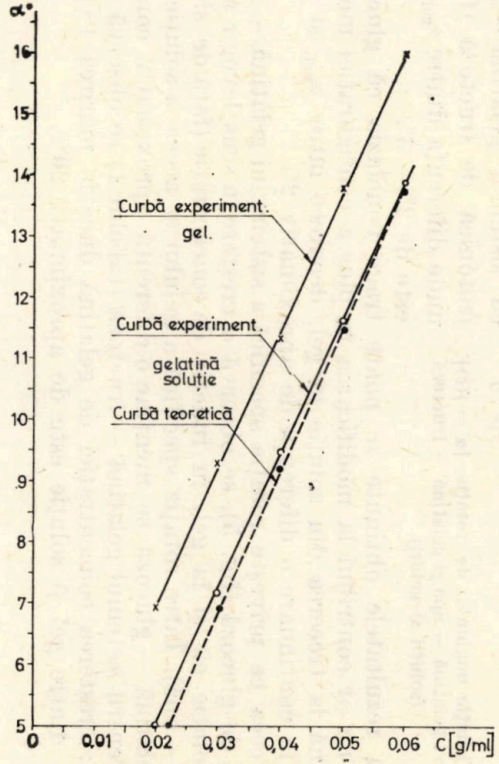


Fig. 1 — Modificarea unghiului de rotaţie la soluţii şi geluri de gelatină în funcţie de concentraţie.

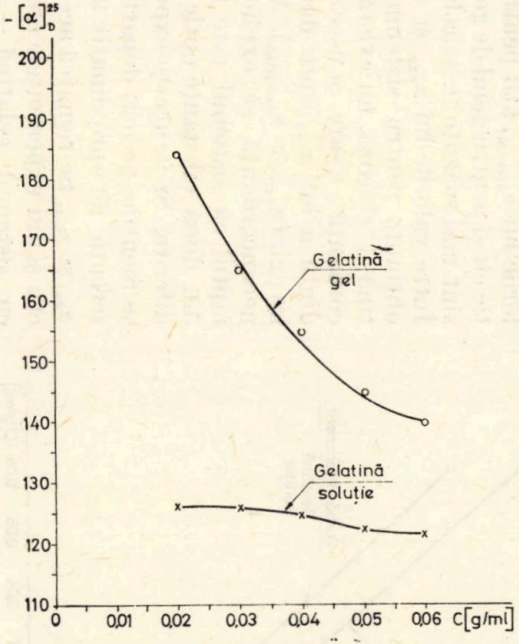


Fig. 2. — Variaţia rotaţiei specifice la gelatină : soluţie şi gel, în funcţie de concentraţie.

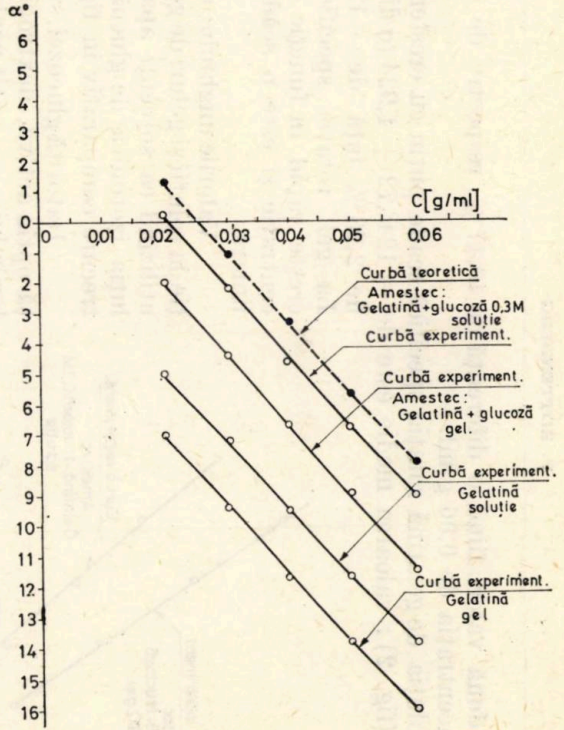


Fig. 3. — Modificarea unghiului de rotaţie [$\alpha = f(c)$] la soluţiile şi gelurile sistemelor : gelatină — apă şi gelatină — glucoză.

între cele două valori fiind o diferență de 46,47 %, respectiv de 16,66 % pentru concentrația de 0,06 g/ml.

La soluția de gelatină rotația specifică scade puțin cu creșterea concentrației (fig. 2) : valoarea medie este de — 124°,72 ± 1,924 (o diferență de 2,23 % față de — 122°,01). La gel, rotația specifică descrește rapid în funcție de concentrație și este o scădere neliniară.

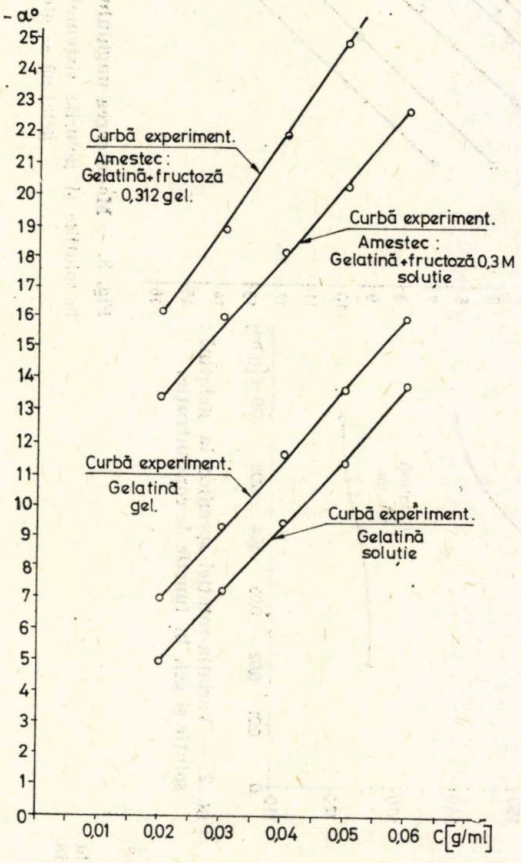


Fig. 4 — Variația unghiului de rotație [$\alpha = f(c)$] la sistemele : gelatină — apă și gelatină — fructoză (soluții și geluri).

Valorile unghiului de rotație la soluții și geluri de gelatină, utilizînd ca solvenți apa și soluția izotonică de glucoză, sînt trecute comparativ în figura 3.

Datorită glucozei, substanță optic activă, dextrogiră, valorile lui α_{sistem}, atît pentru soluție cît și pentru gelul de gelatină, sînt mai scăzute în sens levogir. Între valorile lui α_{exp} și $\alpha_{calculat}$, obținute pentru sistemul gelatină + glucoză, nu există o concordanță : apare o ușoară tendință a lui α_{exp} spre domeniul levogir ($\alpha_{exp} > \alpha_{calculat}$). Această neconcordanță se explică prin faptul că sistemul este format din două substanțe optic active diferite. Și în aceste experiențe se menține pe mai departe o diferență de aproximativ 2° între α_{gel} și α_{sol}. Se remarcă același lucru și din experiențele efectuate cu sistemul gelatină — soluție izotonică de fructoză (fig. 4), unde diferența dintre α_{gel} și α_{sol} este de 2° — 3°.

Din rezultatele obținute se poate trage concluzia că glucoza și fructoza nu ar contribui la modificarea în plus a configurației moleculei de gelatină la trecerea din soluție în gel, deoarece între α_{gel} și α_{sol} se menține în continuare o diferență de aproximativ 2°.

În ceea ce privește rotația specifică a sistemului gelatină — soluție izotonică de glucoză (fig. 5), se observă o creștere în sens levogir a $[\alpha]_D^{25}$, atît la soluție cît și la gel, în funcție de concentrație (față de sistemul gelatină — apă). Între rotația specifică a gelului și aceea a soluției sistemului gelatină — glucoză se menține o diferență aproximativ constantă de 11°. Pentru sistemul gelatină — fructoză (tabelul 1) se observă același fenomen : creșterea concentrației de gelatină duce la mărirea $[\alpha]_D^{25}$, iar diferența dintre gel și soluție este de aproximativ 20°.

Față de gelatină — apă, rotația specifică a soluțiilor și gelurilor de gelatină are valori diferite la sistemul levogir — dextrogir (gelatină — glucoză) și la cel levogir — levogir (gelatină — fructoză). Așa, de exemplu, pentru concentrația gelatinei de 0,06 g/ml, valorile rotației specifice sînt :

Sistem :	gelatină + apă	gelatină + *D*-glucoză	gelatină + *D*-fructoză
Soluție	— 122°	— 40°	— 105°,555
Gel	— 140°,35	— 51°,316	— 126°,00

Ar fi de remarcat că rotația specifică a gelurilor de gelatină — apă crește cu scăderea concentrației. Aceasta s-ar putea explica astfel : cu cît gelul are o concentrație mai mare, cu atît în ochiurile rețelei se găsește o cantitate mai mare de gelatină în soluție, determinînd o rotație mai apropiată de a soluțiilor : cu cît concentrația e mai mică, schimbarea raportului molecule în soluție/molecule de gel, în favoarea acestora din urmă, ar explica îndepărtarea rotației specifice de aceea a soluției, pe măsură ce gelul e mai diluat.

Tabela 1

Rotația specifică a soluțiilor și gelurilor de gelatină, solvent soluția izotonică de fructoză. T = 25°C; λ = 5893Å

c (g /ml)	$[\alpha]_D^{25}$ soluție	$[\alpha]_D^{25}$ gel
0,02	— 95,714	—115,714
0,03	—100,629	—119,811
0,04	—101,116	—122,905
0,05	—105,583	—125,903
0,06	—105,555	—126,000

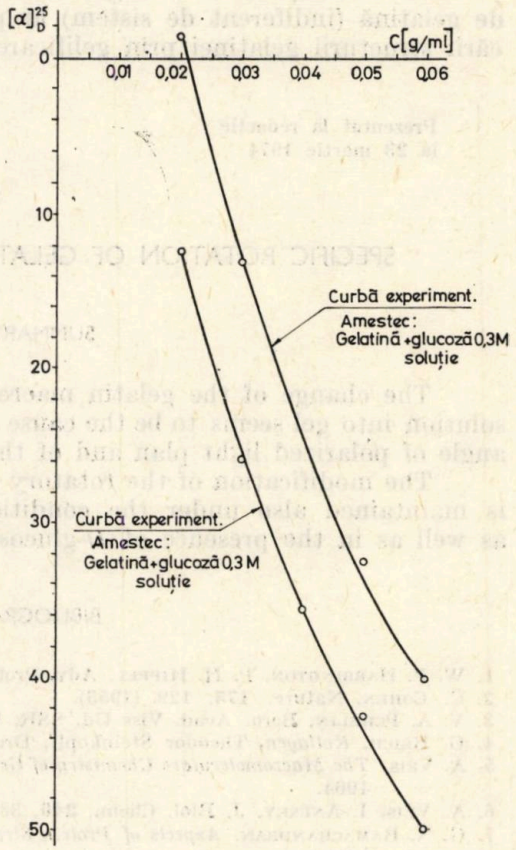


Fig. 5 — Variația rotației specifice la sistemul gelatină — glucoză (soluții și geluri) în funcție de concentrația gelatinei.

CONCLUZII

1. Gelificarea soluțiilor sistemului de referință gelatină — apă determină (pentru concentrații egale și temperatură constantă) modificarea unghiului de rotație și a rotației specifice.

a) unghiul de rotație al gelurilor e cu 2° diferit de al soluțiilor,

b) în funcție de concentrație, rotația specifică a soluțiilor este neglijabilă, pe cînd aceea a gelurilor este evidentă.

2. Soluţiile şi gelurile sistemelor gelatină — glucoză şi gelatină — fructoză au unghiurile de rotaţie diferite în comparaţie cu soluţiile şi gelurile sistemului de referinţă gelatină — apă :

a) pentru sistemul gelatină — glucoză (levogir — dextrogir) efect compensator,

b) pentru sistemul gelatină — fructoză (levogir — levogir) efect aditiv.

3. La sistemele gelatină — glucoză şi gelatină — fructoză, cu modificarea concentraţiilor de gelatină se menţin diferenţe constante ale rotaţiei specifice între soluţii şi geluri.

4. Diferenţa de 2° a unghiului de rotaţie dintre soluţiile şi gelurile de gelatină (indiferent de sistem) ar putea fi o dovadă în plus a modificării structurii gelatinei prin gelificare.

Prezentat la redacţie
la 23 martie 1974

Disciplina de biofizică
Institutul de medicină
Timişoara

SPECIFIC ROTATION OF GELATIN SOLUTIONS AND GELS

SUMMARY

The change of the gelatin macromolecule form when passing from solution into gel seems to be the cause of the modification of the rotatory angle of polarized light plan and of the specific rotation.

The modification of the rotatory angle (and of the specific rotation) is maintained also under the conditions of a constant temperature, as well as in the presence of *D*-glucose and *D*-fructose.

BIBLIOGRAFIE

1. W. F. Harrington, P. H. Hippel, Adv. Prot. Chem., **16**, 1 (1961).
2. C. Cohen, Nature, **175**, 129 (1955).
3. V. A. Pchelin, Bero. Acad. Viss Ud. SSR, **154**, 874 (1964).
4. G. Reich, *Kollagen.* Theodor Steinkopff, Dresden, 1966.
5. A. Veis, *The Macromoleculare Chemistry of Gelatin*, Academic Press, New York, London, 1964.
6. A. Veis, I. Anesey, J. Biol. Chem., **240**, 3889 (1965).
7. G. N. Ramachandran, *Aspects of Protein Structure*, Academic Press, London, New York, 1963.
8. P. R. Saunders, A. G. Ward, *Rheology of Elastomers*, Pergamon Press, New York, 1958.
9. J. Bello, Biochemistry, **2**, 276 (1963).
10. H. Boedtker, P. Doty, J. Physics. Chem., **58**, 968 (1954).
11. R. A. Milch, Nature, **202**, 84 (1964).

ST. CERC.. BIOCHIM., 18 1, 29–35 (1975)

STUDIUL PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE ȘI MECANICE ALE AGAROIDULUI DIN ALGA *PHYLLOPHORA NERVOSA* (MAREA NEAGRĂ)

HORST D. SCHELL, IRINA CORNOIU ȘI TRAIAN BENȚIA

Rezumat. — Se prezintă datele experimentale obținute la studiul unui produs natural indigen poliglucidic obținut din alga *Phyllophora nervosa*, recoltată din Marea Neagră. Produsul se prezintă sub formă de pulbere albă, solubilă în apă la cald. Prin răcire soluțiile calde formează geluri. Prezența grupărilor acide în molecula agaroidului face gelurile improprii pentru electroforeza în gel. Prin legarea încrucișată cu epiclorhidrină a agaroidului nativ se obțin produși insolubili, care pot fi folosiți atît în cromatografia de excludere moleculară cît și în cromatografia de schimb ionic. Prin introducerea suplimentară de funcțiuni schimbătoare de ioni acide (carboximetil) sau bazice (dietilaminoetil) în molecula polizaharidului legat încrucișat se obțin, pe de o parte, schimbători de ioni acizi, cu o capacitate de schimb crescută, sau schimbători de ioni de tip amfion. Aplicați în cromatografia de excludere moleculară și în cea de schimb ionic manifestă o bună capacitate de separare.

Cromatografia de excludere moleculară și cea de schimb ionic fac parte, în prezent, din metodele analitice și preparative cele mai răspîndite și des folosite și nu lipsesc, practic, din nici un laborator de biochimie sau de chimie organică preparativă care se ocupă cu separarea, purificarea și studiul analitic al macromoleculelor biologic importante. Aceasta explică atenția deosebită ce se acordă schimbătorilor de ioni și sitelor moleculare, precum și numărul mare de produși de acest tip, brevetați în majoritatea lor și oferiți de firme producătoare din străinătate.

În lucrarea de față prezentăm datele experimentale obținute în studiul unui produs natural indigen glucidic obținut din alga *Phyllophora nervosa*, recoltată din Marea Neagră, și pus la dispoziție de Institutul român de cercetări marine, în vederea stabilirii posibilităților de valorificare superioară a lui. Astfel, se arată modul de preparare al unor derivați de sinteză ai agaroidului natural cum ar fi produsul său legat încrucișat cu epiclorhidrină care nu se mai dizolvă în apă, are structura unei rețele tridimensionale și proprietățile unui schimbător de ion acid, apoi derivații obținuți prin introducerea suplimentară de funcțiuni schimbătoare de ioni acide (carboximetilice) sau bazice (dietilaminoetilice) în molecula agaroidului legat încrucișat, mărind astfel pe de o parte capacitatea de schimb a produsului natural sau realizînd un schimbător de ion de tip amfion care cuprinde în moleculă atît grupări acide cît și bazice. În continuare se prezintă indicii caracteristici ai schimbătorilor de ioni obținuți, cum sînt capacitatea de schimb, de imbibiție și de umflare, umiditatea și în sfîrșit capacitatea de separare la cromatografie de excludere moleculară sau de schimb ionic testată cu albumină serică bovină sau lizozim sau un amestec format din acestea.

MATERIAL ȘI METODĂ

Agaroidul folosit în studiul nostru a fost obținut din alga *Phyllophora nervosa* și se prezintă sub forma unei pulberi albe, similare agarozei, solubilă în apă la fierbere. Soluțiile sale obținute la cald formează prin răcire geluri transparente începînd cu concentrația de 3%.

Legarea încrucișată a agaroidului. Se procedează conform indicațiilor date pentru agaroză în brevetul românesc nr. 55792/1968 (1), introducînd treptat 10 g agaroid în 30 ml soluție de NaOH 10 N, răcită în jur de 0°C. După 30 min de amestecare se adaugă, tot la rece, în cîteva porțiuni, 5 g epiclorhidrină, continuînd cu amestecarea încă 20—30 min. Apoi se încălzește vasul cu amestecul de reacție timp de o oră, la 40—45°C, pe o baie de apă. Se formează un gel fragil care, prin amestecare cu o baghetă, se fărîmițează în particule mici. Pentru terminarea reacției se continuă încălzirea încă 2—3 ore, la 70—75°C. Produsul de reacție este apoi spălat și uscat conform indicațiilor de mai sus (1). Se obțin 10,5 g agaroid, legat încrucișat prin punți glicerice care nu se mai dizolvă în apă nici la fierbere.

Pentru a obține un preparat cu pori mai mici s-a sintetizat în aceleași condiții și un produs corespunzător la 10 g de epiclorhidrină.

Introducerea de grupări acide schimbătoare de ioni (carboximetil) în molecula agaroidului legat încrucișat. 10 g de agaroid legat încrucișat (mărimea particulelor 50—100 mesh) se introduc în 30 ml soluție de NaOH 10 N, răcită în jur de 0°C, respectînd condițiile din brevetul românesc nr. 55792/1968 (1), indicate pentru prepararea CM-agarozei. Se adaogă apoi, cu agitare, 5 g acid monocloracetic, dizolvat în 6 ml apă distilată și se încălzește totul 30 min pe baie de apă, la 70—75°C. Produsul de reacție se spală apoi de repetate ori cu apă distilată, prin decantare, și se suspendă în 20 ml acid acetic glacial. După 50 min se îndepărtează acidul acetic, prin filtrare la trompă, se spală cu apă distilată, pînă la îndepărtarea completă a acidului, și se usucă gelul granulat după o prealabilă deshidratare cu alcool sau acetonă. Se obțin 10 g CM-derivat al agaroidului.

Introducerea de grupări bazice schimbătoare de ioni (dietilaminoetil) în molecula agaroidului legat încrucișat. 10 g din agaroidul legat încrucișat (mărimea particulelor 50—100 mesh) se introduc în 30 ml soluție de NaOH 5 N, răcită în jur de 0°C, și se agită 30 min timp după care se adaugă 6 g clorhidrat de 1-clor-2-dietilaminoetan, dizolvat în 12 ml apă distilată, continuîndu-se amestecarea încă 30 min la 80—85°C, pe baia de apă. Produsul de reacție rezultat se spală prin decantare cu multă apă distilată și se filtrează la trompă. Produsul de pe filtru se tratează apoi cu cîte 40 ml soluție de NaOH 1N, HCl 1 N și iarăși NaOH 1 N, apoi se suspendă peste noapte în 200 ml NaOH 0,2 N. A doua zi se filtrează la trompă și se spală gelul granulat de pe filtru, cu apă distilată, pînă la îndepărtarea completă a hidroxidului, se deshidratează cu etanol sau acetonă și se usucă. Se obțin 10 g de DEAE-derivat al agaroidului.

Determinarea capacității de schimb s-a efectuat prin titrare potențiometrică (2).

Determinarea conținutului în umiditate (3). Se cîntărește cu precizie, pe o sticlă de ceas, o cantitate anumită, de pildă 1 g, din schimbătorul de analizat și, după ce a fost apoi uscat 10 ore la 60°C, schimbătorul

este din nou cîntărit cu precizie. Diferența de greutate reprezintă conținutul în umiditate al gelului și se exprimă în procente.

Capacitatea de imbibiție. Această caracteristică a schimbătorilor de ioni se exprimă în g apă reținută de 1 g schimbător de ion uscat și s-a determinat după indicațiile date de Flodin (4).

Capacitatea de umflare (5). 1 g din schimbătorul de ioni, uscat peste noapte în etuvă, la 60°C, se suspendă în 50 ml apă distilată și se lasă 24 ore la umflat. Apoi se trece totul într-un cilindru gradat de 50 ml și se citește după 1 oră de repaus volumul ocupat de particulele de gel.

Comportarea gelului la cromatografia de excludere moleculară (gel-filtrare). Peste o coloană de 1 × 18 cm din agaroidul nativ legat încrucișat (dimensiunea particulelor 50—100 mesh, capacitatea de schimb 1,6 mval/g) și echilibrat cu tamponul de eluție, se aplică un amestec format din 10 mg albumină serică bovină (G.M. 68000) și 15 mg lizozim (G.M. 14500), dizolvate într-un ml de soluție tampon TRIS-HCl, pH 8,0. Ca eluant se folosește același tampon, care conține și NaCl 2 M. Concentrația ionică și pH-ul tamponului de eluție au fost astfel alese ca gelul să-și poată manifesta numai proprietățile sale de excludere moleculară, nu și pe cele de schimbător de ioni. S-a lucrat cu un colector automat de fracțiuni cu o viteză de scurgere de 40ml/oră, culegînd fracțiuni de cîte 3 ml.

COMPORTAREA GELULUI LA CROMATOGRAFIA DE SCHIMB IONIC

1. — *Gelul nativ legat încrucișat.* Se folosește o coloană de 1×18 cm (dimensiunea particulelor de gel 50—100 mesh, capacitatea de schimb 1,6 mval/g) pe care se aplică 15 mg de lizozim sau albumină serică bovină, dizolvate în 0,5 ml soluție tampon acetat, pH 4,5 0,1 M. Se eluează cu o soluție de NaOH 0,1 M, colectînd fracțiuni de 3 ml, la o viteză de scurgere de 40 ml/oră.

2. — *CM-derivat al agaroidului.* Se lucrează în aceleași condiții ca și în cazul gelului nativ legat încrucișat.

3. — *DEAE-derivat al agaroidului.* Într-o coloană de 1 × 18 cm încărcată cu gelul granulat (50—100 mesh), în molecula căruia au fost introduse grupări bazice de schimb ionic (0,7 mval/g), se introduc 15 mg de lizozim sau albumină serică bovină, dizolvate în 0,5 ml soluție tampon TRIS-HCl, pH 8,0, 0,1 M, și se eluează cu o soluție 0,1 M de NaOH, colectînd fracții de 3 ml, la un colector automat de fracțiuni, cu o viteză de scurgere de 40 ml/oră.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Agaroidul obținut din alga *Phyllophora nervosa* se prezintă sub forma unei pulberi albe, solubile în apă caldă, din care precipită cu alcool și acetonă. Soluțiile apoase făcute la cald, mai concentrate de 3%, formează prin răcire geluri transparente care nu pot fi folosite însă la electroforeza în gel, datorită curentului puternic de electroendosmoză cauzat de prezența de grupări acide în molecula agaroidului nativ. Consistența particulelor de gel nativ, granulat, nu permite folosirea lui în coloane

cromatografice, nici chiar la concentrații mai mari de 5—8%. Legînd însă încrucișat moleculele poliglucidice ale agaroidului cu epiclorhidrină, prin punți glicerice, se obține un produs insolubil în apă, chiar și la fierbere, cu proprietăți mecanice foarte bune, care încărcat în coloane cromatografice, permite viteze de scurgere similare cu cele ale produșilor de tip Sephadex.

Tabela 1

Caracteristicile principale ale gelurilor schimbătoare de ioni obținute de la agaroidul din *Phylophora nervosa* Marea Neagră

Nr. crt.	Schimbătorul de ioni	Capacitatea de schimb mval/g	Capacitatea de imbibiție g apă/g	Capacitatea de umflare ml/g	Conținutul în umiditate g apă/100 g
1	Agaroidul nativ legat încrucișat	1,6	14,0	26	3,1
2	CM-derivatul agaroidului legat încrucișat	2,1	12,5	24	8,5
3	DEAE-derivatul agaroidul legat încrucișat	0,7*	9,5	20	5,2

*) Titrat atît ca bază cît și ca acid.

După cum rezultă din tabela 1 și din curbele de titrare potențiometrică (fig. 1 și 2), agaroidul nativ legat încrucișat are o capacitate de schimb de 1,6 mval/g. Prin introducerea de grupări acide suplimentare

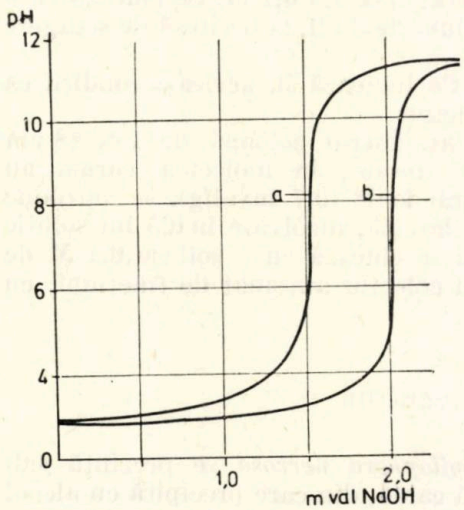


Fig.1. — Curbele de titrare potențiometrică a agaroidului legat încrucișat (a) din *Phyllophora nervosa* și a CM-derivatului său (b).

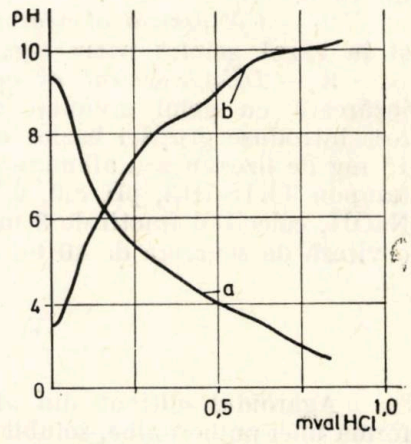


Fig. 2. — Curbele de titrare potențiometrică a amfionului rezultat prin introducerea de grupări dietilaminoetilice (DEAE) în molecula agaroidului legat încrucișat. a) Produsul titrat ca bază; b) Produsul titrat ca acid.

(carboximetil), capacitatea de schimb crește la 2,1 mval/g. Introducînd grupări bazice (dietilaminoetil) în molecula polizaharidică a agaroidului, se obține un amfion care, titrat ca bază, indică o capacitate de schimb de 0,7 mval/g, iar ca acid, tot de 0,7 mval/g (fig. 2).

Prin variația cantităților de acid monocloracetic și de 1-clor 2-dietilaminoetan se pot obține și schimbători de ioni cu capacități de schimb mai mici sau mai mari. Modificînd, de asemenea, cantitatea de epiclorhidrină folosită la legarea încrucișată a agaroidului nativ, se pot obține produși cu o rețea tridimensională mai mult sau mai puțin densă, adică cu pori mai mari sau mai mici. Conținutul în umiditate al produșilor obținuți variază între 3,1—8,6 g apă/100 g produs uscat. Capacitatea de im-

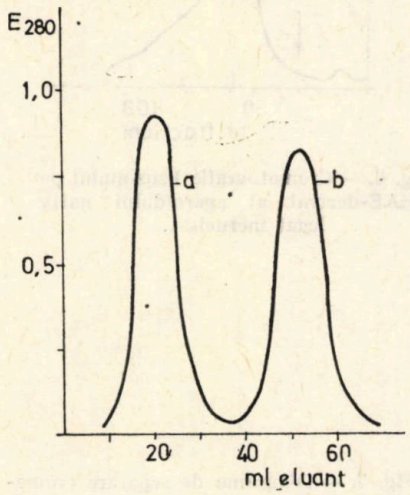


Fig. 3. — Diagrama de separare a albuminei serice bovine (a) de lizozim (b) prin gel-filtrare pe agaroidul nativ legat încrucișat (explicații în text).

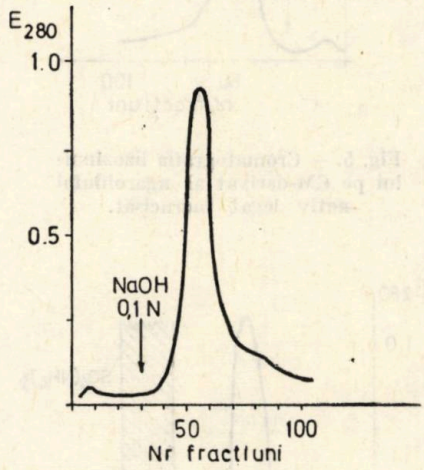


Fig. 4. — Cromatografia lizozimului pe agaroidul nativ legat încrucișat.

bibiție și de umflare variază de la produs la produs și este maximă la agaroidul nativ legat încrucișat. Valorile obținute sînt de același ordin de mărime ca și în cazul unor schimbători de ioni acizi și bazici obținuți de la agaroză legată încrucișat (6).

Pentru testarea capacității de schimb și de rezoluție a gelurilor studiate s-a lucrat cu albumină serică bovină și cu lizozim sau cu un amestec al acestora. În cazul agaroidului nativ legat încrucișat s-a putut obține o separare netă a albuminei de lizozim în condițiile de gel-filtrare (fig. 3).

Lucrînd în condițiile în care gelurile își pot manifesta proprietățile lor de schimb ionic, se constată, la toate cele trei produse studiate, diagrame de eluție caracteristice pentru cromatografia de schimb ionic (fig. 4, 5, 6,).

În vederea testării capacității de desalifiere a gelului de tip amfion s-a aplicat pe o coloană o probă formată dintr-un amestec de 15 mg lizozim și 300 mg sulfat de amoniu, dizolvate în 3 ml apă distilată. După cum rezultă din figura 7, gelul separă proteina de sarea de amoniu.

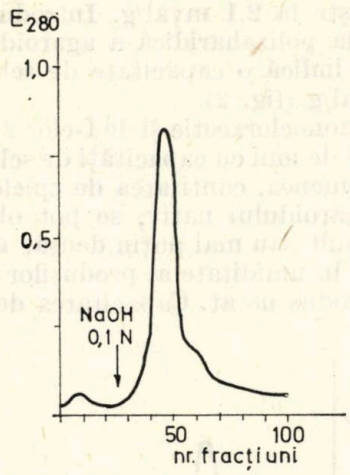


Fig. 5. — Cromatografia lizozimului pe CM-derivat al agaroidului nativ legat încrucișat.

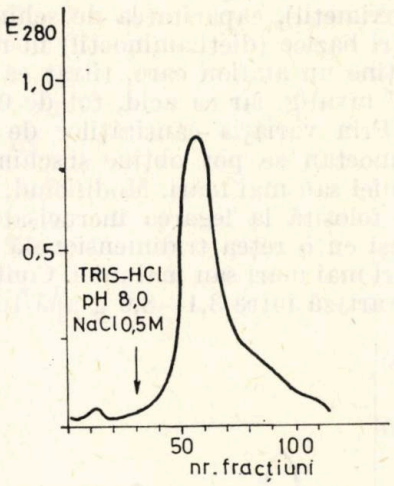


Fig. 6. — Cromatografia lizozimului pe DEAE-derivat al agaroidului nativ legat încrucișat.

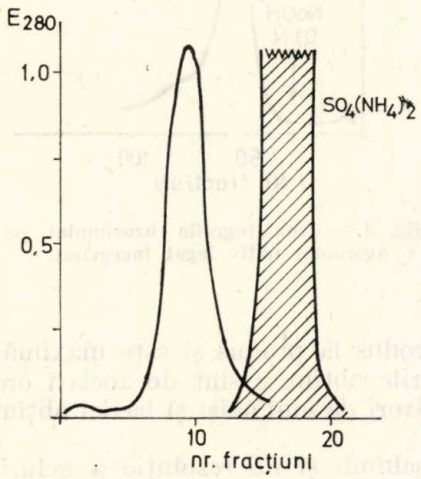


Fig. 7. — Diagrama de separare cromatografică a albuminei serice bovine de sulfatul de amoniu pe DEAE-derivatul agaroidului legat încrucișat (schimbătorul de ioni tip amfiion).

CONCLUZII

1. — Prin legarea încrucișată cu epiclorhidrină a agaroidului nativ se obține un gel schimbător de ioni acid, insolubil, care, încărcat în coloane cromatografice, permite viteze de scurgere foarte bune și poate fi folosit atît în cromatografia de excludere moleculară (gel-filtrare) cît și în cromatografia de schimb ionic.

2. — Prin variația cantității de epiclorhidrină folosită la legarea încrucișată a moleculei agaroidului se poate modifica limita de excludere moleculară, obținînd produși cu o rețea mai laxă sau mai densă.

3. — Prin introducerea de grupări carboximetil în molecula agaroidului legat încrucișat se pot obține geluri cu capacități de schimb crescute.

4. — Prin introducerea de grupări dietilaminoetil în molecula agaroidului legat încrucișat se obțin schimbători de ioni de tip amfion, care pot fi folosiți mai ales la separarea proteinelor de acizi și săruri.

Prezentat la redacție la 26 aprilie 1974

Departamentul de biochimie
Institutul de științe biologice
București

THE STUDY OF PHYSICOCHEMICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF THE AGAROID FROM ALGA *PHYLLOPHORA NERVOSA* (BLACK SEA)

SUMMARY

Some experimental data obtained in the study of a polysaccharide native natural product from the alga *Phyllophora nervosa* harvested in the Black sea are presented. The polysaccharide product occurs as a white powder, similar to agarose, which is soluble in warm water. By cooling warm aqueous solutions yield gels starting with 3% concentrations. Due to the presence of acid groups in the agaroid molecule (1,6 mval/g exchange capacity) these gels are improper to gel electrophoresis. By cross-linking the polysaccharide molecules of the native agaroid, with epiclorhydrin, some insoluble products with a threedimensional network structure are obtained; they can be used for both molecular exclusion and ion exchange cromatography. By additionally introducing in the cross-linked polysaccharide molecule some acid (carboximethyl) or basic (diethylaminoethyl) ion exchange groups either acid ion exchangers with increased exchange capacity or amphion ion exchangers including both acid and basic groups in their molecules are obtained. The behaviour at molecular exclusion and ion-exchange chromatography as checked with two proteins with different molecular weights (bovine serum albumin and lysozyme) shows that the products have a characteristic resolution capacity for this type of derivatives.

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. Schell, V. Gheție, Derivați de sinteză ai agarozei și procedeu de obținere a lor, Brevet românesc nr. 55792/28. IX. 1968.
2. *** Serva Cellulose-Ionenaustauscher, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, 1962.
3. M. E. Carsten, Ion Exchange Celluloses, Bibliography, California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles, 1962.
4. P. Flodin, Dextran gels and their applications in gel filtration, Meijels Bokindustri, Uppsala, 1962.
5. M. Ryban, Z. Brada, I. M. Hais, Säulenchromatographie an Cellulose-Ionenaustauscher, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1966, p. 100.
6. H. D. Schell, V. Gheție, Rev. roum. Biochim. **9**, 165 (1972).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 1, 37–44 (1975)

INFLUENȚA IONILOR DE POTASIU, RUBIDIU ȘI CESIU ASUPRA NIVELULUI FOSFOCREATINEI DIN MUȘCHIUL GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ

LORA SCOLNIC

Rezumat. S-a urmărit nivelul fosfocreatinei din mușchiul gastrocnemian de broască, imersat în soluție Ringer suplimentată cu ioni de K^+, Rb^+, și Cs^+.
Absența ionului de K^+ din mediul de imersie, nu modifică nivelul fosfocreatinei, în timp ce prezența acestuia în soluție hipertonică și respectiv izotonică, determină un efect stimulator asupra biosintezei fosfocreatinei.
Prezența ionilor de fosfat în mediul de imersie, mărește nivelul de bază al fosfocreatinei și accentuează efectul stimulator al K^+, fapt ce pledează pentru participarea fosfatului la biosinteza fosfocreatinei.
Ionii de Rb^+ se comportă similar celor de K^+, ceea ce indică nespecificitatea acestuia la biosinteza fosfocreatinei.
Comportarea ionilor de Cs^+ este contrară aceleia a K^+ și Rb^+, inhibînd biosinteza fosfocreatinei.

Efectele biologice ale metalelor alcaline au format obiectul a numeroase investigații în diferite sisteme, de cînd Ringer (1) a arătat că, pe preparatele cordului izolat de broască, Rb^+ este un mai bun substituent al K^+ decît Cs^+.

Preferința țesutului muscular *in situ* pentru acești cationi diminuă în ordinea : $Cs^+ \geq Rb^+ \geq K^+$ (2); din acest motiv, atît Rb^+ (3) cît și Cs^+ (4) pot deplasa K^+, care este apoi eliminat.

Mușchiul izolat de broască imersat într-o soluție în care se găsesc ioni de Cs^+, Rb^+ și K^+, concentrează acești ioni ordinea : $Rb^+ \geq K^+ \geq Cs^+$ (5).

Studii cu izotopi radioactivi arată că, la forțe electrochimice echivalente, fluxul Rb^+ prin membranele celulare este aproximativ jumătate din cel al K^+; Cs^+ pătrunde mai încet prin membrană (6) și pare să aibe un efect intermediar ionilor de K^+ și Na^+ (7).

Experiențele lui Swan și Keynes (8) demonstrează că parte din pătrunderea K^+ în celule este cuplată cu eliminarea Na^+, fapt ce s-a dovedit valabil și în cazul Rb^+ (9) sau Cs (10).

Adrian și Slayman (11), precum și Beaugé și Sjodin (10) au arătat că influxul ionilor se realizează printr-un mecanism de transport activ, fiecare ion exercitînd un efect competitiv specific și diferit asupra adsorbției celuilalt (12).

Este bine cunoscut că acești ioni, pe lîngă funcțiile lor de reglare osmotică a lichidelor tisulare și a activării diferitelor enzime, joacă un rol esențial în menținerea integrității și permeabilității membranelor celulare (13).

Influențele Rb^+ și, cu unele excepții ale Cs^+, amintesc pe cele ale K^+, cu o ordine diferită a eficienței la vertebrate și nevertebrate (14).

Întrucît transportul ionic este influenţat de metabolismul celular, acesta, la rîndul său, ar fi de aşteptat să influenţeze metabolismul celular.

Unele date din literatură arată relaţia strînsă care există între conţinutul muşchiului în potasiu, fosfat anorganic şi creatină (15), (16). Creşterea nivelului de creatină şi fosfat ar conduce, după Nachmansohn (17), Markiewicz şi Rogozkin (18), la creşterea nivelului fosfocreatinei din muşchi.

Ar fi de aşteptat deci, ca imersarea unui muşchi în soluţie Ringer suplimentată cu ioni de K^+, care se ştie că pătrund în muşchi pe măsura creşterii concentraţiei lor în mediul exterior (19), să ducă la creşterea nivelului de fosfocreatină.

Unele cercetări efectuate pe felii de cortex cerebral (20), ca şi pe muşchi de broaşte Buffo (21), arată însă că, ionii de K^+ scad nivelul fosfocreatinei.

Dată fiind această neconcordanţă, ni s-a părut interesant de reluat cercetările în această direcţie, şi să urmărim modul în care K^+ şi substituenţii săi, Rb^+ şi Cs^+ influenţează nivelul fosfocreatinei, componentă macroergică importantă în metabolismul celular.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe broaşte *Rana ridibunda* la temperatura laboratorului. După amputarea simultană a picioarelor posterioare, muşchii gastrocnemieni au fost izolaţi atent în vederea evitării traumatismului, tamponaţi uşor pe hîrtie de filtru, cîntăriţi, apoi imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassick (22) conţinînd la litru : 6,5 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g $CaCl_2$ şi 0,1 g CO_3HNa.

Influenţa ionilor de K^+, Rb^+ şi Cs^+ s-a urmărit introducîndu-i, în locul KCl din soluţia Ringer, sub forma clorurilor respective, concentraţia ionilor variind între 0—50 mM/l, soluţia devenind hipertonică. Dat fiind că hipertonicitatea modifică unele caracteristici ultrastructurale ale membranelor (23) ca şi metabolismul celular (24), pentru a urmări dacă un eventual efect constatat în conţinutul fosfocreatinei nu s-ar datora hipertonicităţii, într-o altă variantă, adaosul ionilor de K^+ s-a făcut pe seama ionilor echivalenţi de Na^+.

De asemenea, pentru a urmări dacă componentele soluţiei Ringer pot influenţa rezultatele, într-o altă variantă, am urmărit influenţa ionului K^+ în soluţie Ringer-Jendrassick suplimentată cu ioni fosfat. În acest scop s-au luat 9,5 părţi dintr-o soluţie M/15 Na_2HPO_4 + 0,5 părţi soluţie M/15 KH_2PO_4 şi s-au adus cu soluţie Ringer-Jendrassick la 100 ml.

Muşchii au fost imersaţi în 10 ml soluţie Ringer timp de 3 ore şi jumătate în cazul ionilor de K^+ şi Rb^+, iar în a celor de Cs^+, dat fiind că pătrunderea acestora este mult încetinită faţă de a acelor de K^+(7), timp de 5 ore şi jumătate. Tot timpul imersării, soluţia a fost barbotată cu un curent constant şi uniform de oxigen, iar la intervale de aproximativ 20 min, conţinutul vasului a fost uşor agitat.

După perioadele menţionate, muşchii scoşi din soluţiile respective, au fost imediat tamponaţi uşor pe hîrtie de filtru, cîntăriţi în balanţa de torsiune şi fixaţi în NaOH 10% după tehnica propusă de Jendrassick şi Faiszt (22), cu modificarea adusă de noi (25). Dozarea fosfocreatinei s-a

efectuat după Alexeeva (26). Rezultatele au fost exprimate în mg creatinină dozată și, fosfocreatină calculată / g mușchi umed.

În experiențele în care ionii de K^+, Rb^+ și Cs^+ au fost adăugați fără scăderea echivalentă a celor de Na^+, s-a constatat, așa cum am arătat și anterior (27) — (29) o scădere evidentă a conținutului în apă totală, iar în cazul în care adaosul ionilor de K^+ s-a făcut pe seama celor de Na^+, o creștere în volum; de aceea, în evaluarea rezultatelor, am avut în vedere variațiile în conținutul apei totale, corespunzătoare fiecărei concentrații.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Înainte de a trece la determinările propriu-zise, am urmărit conținutul în fosfocreatină al mușchilor pereche proveniți de la una și aceeași broască, imersați în soluție Ringer fără adaosul vreunui ion. Am obținut o concordanță satisfăcătoare, fapt ce a permis studiul tratamentului pe aceeași broască, de la care unul din mușchi a servit drept martor.

Tabela 1

Valorile fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassick, cu adaos de cantități diferite de KCl

Mușchi martor = M
Mușchi tratat cu KCl = K

Conc. KCl mM/l	Creatinină mg/g mușchi umed		Fosfocreatină mg/g mușchi umed		Diferența mg/g mușchi umed
	M	K	M	K	K — M
0	2,32	2,36	4,33	4,42	0,09
	2,05	2,33	3,83	4,37	—0,06
	2,24	2,06	4,18	3,85	0,33
	1,97	2,04	3,68	3,81	0,13
Media	2,15	2,20	4,00	4,11	0,11
10	2,43	2,67	4,55	5,00	0,45
	1,90	2,04	3,54	3,81	0,27
	2,21	2,36	4,12	4,40	0,28
	2,25	2,54	4,20	4,74	0,54
Media	2,20	2,40	4,10	4,49	0,38
20	1,97	2,30	3,68	4,29	0,63
	1,74	2,13	3,25	3,97	0,72
	2,53	3,00	4,74	5,61	0,87
	1,86	2,15	3,47	4,01	0,54
Media	2,01	2,40	3,77	4,46	0,69
50	1,92	2,52	3,59	4,71	1,12
	1,97	2,50	3,68	4,66	0,98
	2,40	3,10	4,47	5,77	1,30
	2,12	2,66	3,95	4,97	1,02
Media	2,12	2,72	3,92	5,03	1,11

Datele trecute în tabela 1, arată că omiterea din mediul de imersie a K^+, nu determină modificarea nivelului fosfocreatinei. Acest fapt con-

cordă cu observaţiile noastre anterioare referitoare la acidul piruvic (27) şi lactic (28).

Datele trecute în aceeaşi tabelă arată că adaosul ionilor de K^+ în concentraţie de 10, 20, şi 50 mM/l determină o creştere semnificativă a conţinutului muşchilor în fosfocreatină, creştere accentuată cu creşterea concentraţiei KCl din mediu.

Menţionăm că datele noastre diferă de cele obţinute pe felii de cortex cerebral (20) ca şi pe muşchi sartorius de broaşte Buffo (21), care semnalează scăderea nivelului fosfocreatinei, la adaosul în mediu extern a K^+. Experienţele amintite au fost efectuate însă, în prezenţa glucozei în mediul de incubare.

Cum o serie de date arată că pătrunderea glucozei în cortex (30) ca şi în muşchi (31), este accentuată sub influenţa ionilor de K^+, credem că rezultatele contradictorii să se datoreze solicitării crescute de fosfat direct (32), (33) sau indirect (34) pe seama fosfocreatinei, pentru fosforilarea glucozei. Efectul K^+ ar fi deci un efect secundar şi s-ar datora pătrunderii crescute de glucoză din mediu în muşchi.

Din tabela 2 se observă că adaosul ionilor în soluţie izotonică, determină de asemenea creşterea nivelului de fosfocreatină. Rezultă deci, că efectul K^+ nu este de natură osmotică.

Tabela 2

Valorile fosfocreatinei din muşchii gastrocnemieni de broască imersaţi în soluţie Ringer-Jendrassick, cu adaos, pe seama NaCl, de KCl

Muşchi martor = M
Muşchi tratat cu KCl = K

Conc. KCl mM/l	Creatinină mg/g muşchi umed determinat		Fosfocreatină mg/g muşchi umed calculat		Diferenţă mg/g muşchi umed
	M	K	M	K	K — M
50	1,97	2,50	3,68	4,66	0,98
	2,09	2,71	3,90	5,05	1,15
	1,84	2,68	3,43	5,00	1,57
	2,49	3,06	4,65	5,70	1,05
Media	2,09	2,74	3,91	5,10	1,19

Tabela 3 arată că adaosul ionilor de Rb^+ în aceleaşi concentraţii are un efect similar celui produs de K^+. Rezultă că efectul Rb^+ asupra nivelului fosfocreatinei, este similar celui produs de K^+ şi creşte pe măsura creşterii concentraţiei lui.

Similitudinea efectelor Rb^+ şi K^+ au fost amplu semnalate prin cercetări fiziologice sau farmacologice şi de alţi autori.

În ceea ce priveşte ionul Cs^+, din tabela 4 reiese că, spre deosebire de K^+ şi Rb^+, Cs^+ determină scăderea fosfocreatinei. Deşi Cs^+ are în general o acţiune similară cu a K^+ asupra ţesuturilor excitabile, literatura semnalează diferenţe specifice în efectele acestor ioni asupra unor procese în celulele musculare, care pînă acum nu au putut fi explicate. O comportare diferită a K^+ şi Cs^+ a fost semnalată anterior de noi şi în ceea ce priveşte permeabilitatea membranei pentru acidul lactic (29) şi fosfatul anorganic (35).

Tabela 3

Valorile fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassick cu adaos de cantități diferite de RbCl

Mușchi martor = M
Mușchi tratat cu RbCl = R

Conc. RbCl mM/l	Creatinină mg/g mușchi umed determinat		Fosfocreatină mg/g mușchi umed calculat		Diferența mg/g mușchi umed
	M	Rb	M	Rb	Rb — M
10	2,41	2,55	4,49	4,75	0,26
	1,79	1,97	3,34	3,68	0,34
	2,03	2,20	3,77	4,09	0,32
	1,94	2,24	3,62	4,18	0,56
Media	2,04	2,24	3,80	4,17	0,37
20	1,88	2,15	3,51	4,02	0,51
	2,11	2,41	3,94	4,50	0,56
	2,17	2,63	4,05	4,90	0,85
	2,12	2,53	3,95	4,73	0,78
Media	2,07	2,43	3,86	4,54	0,67
50	1,82	2,38	3,40	4,44	1,04
	2,18	2,66	4,05	4,96	0,91
	1,95	2,58	3,62	4,82	1,20
	2,04	2,61	3,81	4,87	1,06
Media	2,00	2,56	3,72	4,77	1,05

Tabela 4

Valorile fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassick, cu adaos de cantități diferite de CsCl

Mușchi martor = M
Mușchi tratat cu CsCl = Cs

Conc. CsCl mM/l	Creatinină mg/g mușchi umed determinat		Fosfocreatină mg/g mușchi umed calculat		Diferența mg/g mușchi umed
	M	Cs	M	Cs	Cs — M
10	2,49	2,09	4,65	3,90	—0,75
	2,24	2,04	4,18	3,80	—0,38
	2,12	1,84	3,95	3,43	—0,52
	1,95	1,72	3,64	3,20	—0,44
Media	2,20	1,92	4,10	3,58	—0,52
20	2,06	1,53	3,85	2,86	—0,99
	2,25	1,65	4,20	3,08	—1,12
	1,96	1,55	3,66	2,90	—0,76
	2,38	1,93	4,45	3,60	—0,85
Media	2,16	1,67	4,04	3,11	—0,93
50	2,30	1,37	4,29	2,55	—1,74
	2,07	1,11	3,87	2,07	—1,80
	2,25	1,39	4,20	2,60	—1,60
	2,40	1,30	4,47	2,43	—2,04
Media	2,25	1,29	4,21	2,41	—1,79

Tabela 5 reflectă faptul că, în mediul de fosfat, ionul de K^+ are un efect stimulator mai accentuat. În acest caz se observă creşterea nivelului de bază şi la muşchiul martor. Acest fapt nu este surprinzător dacă ţinem seama de indicaţia dată de Nachmansohn (17), Markiewicz şi Rogozkin

Tabela 5

Valorile fosfocreatinei din muşchii gastrocnemieni de broască imersaţi în soluţie Ringer-fosfat, cu adaos de KCl

Muşchi martor = M
Muşchi tratat cu KCl = K

Conc. KCl mM/l	Creatinină mg/g muşchi umed		Fosfocreatină mg/g muşchi umed		Diferenţa mg/g muşchi umed
	M	K	M	K	K–M
50	2,31	3,00	4,30	5,58	1,28
	2,78	3,41	5,19	6,37	1,18
	2,95	3,70	5,49	6,90	1,41
	2,60	3,32	4,83	6,19	1,36
Media	2,66	3,37	4,95	6,26	1,31

(18), după care introducerea ionului fosfat în mediul de imersie al muşchiului de broască, ca şi pe cale intraperitoneală la şobolan, măresc randamentul organismului, prin stimularea producerii de fosfocreatină.

Creşterea efectului stimulator produs de K^+ în mediul de fosfat, credem că s-ar datora creşterii, sub influenţa K^+ a permeabilităţii membranei musculare pentru ionul fosfat şi participării acestuia la sinteza fosfocreatinei, pe seama creatinei libere existente în muşchi. Creşterea permeabilităţii pentru fosfat, determinată de K^+ a mai fost semnalată şi de Vîsresenţeva, pe rădăcinile de dovleac (36). Ea a mai fost evidenţiată anterior şi de noi în cazul acidului piruvic (27) şi lactic (28) şi constatată recent şi în cazul ionului fosfat (35).

Steinbach (37) semnalează activarea prin K^+ a proceselor de transfer ale fosfaţilor.

S-ar putea, ca nivelul crescut al fosfocreatinei musculare, sub influenţa ionilor de K^+ şi Rb^+, să se datoreze atît transferului grupării fosfat de pe compuşii organo-fosforici pe creatină, cît şi combinării directe a fosforului anorganic liber cu creatina, sau ambelor fenomene. Urmărirea efectului acestor ioni asupra conţinutului în fosfat anorganic intern este în curs de studiu.

CONCLUZII

1. Absenţa ionului de K^+ din mediul de imersie nu modifică nivelul fosfocreatinei din muşchiul gastrocnemian de broască.

2. Adaosul ionilor de K^+ în concentraţie de 10, 20 şi 50 mM/l, fără modificarea conţinutului în sodiu, determină o creştere evidentă a conţinutului în fosfocreatină al muşchilor.

3. Ionii de K^+ în soluţie izotonică, determină de asemenea, un efect stimulator asupra sintezei fosfocreatinei, ceea ce denotă că efectul K^+ nu este de natură osmotică.

4. Prezența ionilor fosfat în mediul de imersie, mărește nivelul de bază al fosfocreatinei și accentuează efectul stimulator al K^+. Acest fapt pledează pentru participarea fosfatului la biosinteza fosfocreatinei, ca și creșterea permeabilității pentru fosfat, sau stimularea participării fosfatului anorganic liber, sub influența K^+, la biosinteza fosfocreatinei.

5. Ionii de Rb^+ se comportă similar celor de K^+, ceea ce arată nespecificitatea acestuia în ceea ce privește producerea de fosfocreatină.

6. Comportarea ionilor de Cs^+ este contrară celei semnalate sub influența ionilor de K^+ și Rb^+. În timp ce ultimii stimulează, primul determină inhibarea biosintezei fosfocreatinei.

Prezentat la redacție la 13 aprilie 1974

Departamentul de biochimie al Institutului de științe biologice

THE INFLUENCE OF K^+, RB^+, AND CS^+ IONS ON CREATINE PHOSPHATE LEVEL IN FROG GASTROCNEMIUS MUSCLES

SUMMARY

The level of creatine phosphate was followed in frog gastrocnemius muscles soaked in Ringer solution supplemented with K^+, Rb^+ and Cs^+ ions.

The absence of K^+ ions in the immersion medium induces no changes in creatine phosphate level whereas their presence within hypertonic or isotonic solutions have a stimulatory effect upon creatine phosphate biosynthesis.

The presence of phosphate ions within imersion media enhances the basic level of creatine phosphate and accentuates the stimulatory effect of K^+, thus favoring the idea of phosphate participation in creatine phosphate biosynthesis.

Rb^+ ions have a similar behavior as K^+ ones, thus indicating the non-specificity of the latter upon creatine phosphate biosynthesis.

Cs^+ ions have an opposite effect as compared to K^+ and Rb^+, inhibiting creatine phosphate biosynthesis.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Ringer, J. Physiol., *4*, 370 (1883).
2. A. S. Relman, A. T. Lambie, B. A. Burrows, J. Clin. Invest., **36**, 1249 (1957).
3. A. S. Relman, Yale J. Biol. Med., **29**, 248 (1956).
4. T. R. Mroz, M. Lenoir, I. Pinagian, H. Patrick, Arch. Biochem. Biophys., **66**, 177(1957).
5. M. Lubin, P. B. Sneider, J. Physiol., **138**, 140 (1957).
6. R. A. Sjodin, L. A. Beaugé, Science, **156**, 1249 (1967).
7. G. Ling, A. Schramolinska, Amer. J. Physiol., **179**, 656 (1954).
8. R. C. Swan, R. D. Keynes, The XXth int. physiol congr. Brussels, 1956 p. 869.
9. R. A. Sjodin, J. Gen. Physiol., **44**, 929 (1961).
10. L. A. Beaugé, R. A. Sjodin, J. Physiol., **194**, 105 (1968).
11. R. H. Adrian, C. L. Slayman, J. Physiol., **175**, 49 P (1964).

12. G. N. Ling, M. M. Ochsenfeld, J. Gen. Physiol., **49**, 819 (1966).
13. J. T. Cummins, H. Mc. Ilwain, Biochem. J., **79**, 330 (1961).
14. D. Gernon jun, Nature, **203**, 1189 (1964).
15. V. C. Myers, G. H. Maguin, J. Biol. Chem., **132**, 701 (1940).
16. V. C. Myers, în L. F. Barker, Endocrinology and Metab., New York and London *3*, 463 (1922).
17. D. Nachmansohn, Biochem. Z., **208**, 237 (1929).
18. L. Markiewicz, W. A. Rogozkin, Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Biol., *7*, 341 (1959).
19. B. Boyle, E. J. Conway, J. Physiol., **100**, 1 (1941).
20. H. Mc. Ilwayn, Biochem. J., **52**, 289 (1952).
21. G. P. Briner, S. E. Simon, R. Frater, P. Tasker, Biochem. Biophys. Acta., **35**, 485 (1959).
22. L. Jendrassick, I. Faiszt, Rolando Eötvos nominatae, Sect. Biol., *1*, 133 (1957).
23. H. E. Huxley, S. Page, O. R. Wilkie, J. Physiol., Lond., **169**, 325 (1963).
24. T. Kuzuya, E. Samols, R. H. Williams, J. Biol. Chem., **240**, 2277 (1965).
25. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **16**, 313 (1973).
26. A. M. Alexeeva, Biohimiia, **16**, 97 (1951).
27. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **15**, 93 (1972).
28. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **16**, 53 (1972).
29. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **16**, 411 (1973).
30. F. S. Ralleston, E. A. Newsholme, Biochem. J., *100*, 64 P (1966).
31. G. Bchattacharya, Biochem. J., **79**, 369 (1961).
32. H. Meyerhoff, J. Biol. Chem., **183**, 377 (1950).
33. R. R. Morton, Nature, London, **172**, 69 (1953).
34. B. Hess, B. Chance, J. Biol. Chem., **236**, 234 (1961).
35. L. Scolnic, date nepublicate.
36. J. Viskreventeva, Fiziol. Rast., *10*, 40 (1963).
37. B. Steinbach în Comp. Biochem. IV. Ed. Florkin, Masson, Acad. Press, New York, London, 1962, p. 701.

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 1, 45–56 (1975)

PROPUNERI DE NORME GENERALE PENTRU NOMENCLATURA ROMÂNĂ ŞI NOTAŢIILE FOLOSITE ÎN BIOCHIMIE

În şedinţa din 11 februarie 1972 a Comisiei de biochimie de pe lîngă Academia Republicii Socialiste România a fost constituit un colectiv însărcinat cu elaborarea unor propuneri de uniformizare a nomenclaturii biochimice folosite în ţara noastră şi de adaptare la normele ortografiei române a nomenclaturii adoptate pe plan internaţional după recomandările Comisiei de nomenclatură biochimică (CBN) a Uniunii internaţionale de chimie pură şi aplicată (IUPAC) şi Uniunii internaţionale de biochimie (IUB).

Colectivul a fost alcătuit din : prof. dr. doc. Eugenia Soru, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România, dr. Dita Cotariu, dr. Eugeniu Păunescu şi prof. dr. Horia Sluşanschi, membru al Academiei de Ştiinţe Agricole şi Silvice.

Propunerile acestui colectiv, într-o primă formă de redactare, au fost trimise în cursul anului 1973, spre examinare, tuturor institutelor de cercetări din ţară care au laboratoare de biochimie, precum şi tuturor catedrelor de biochimie din instituţiile de învăţămînt superior. Observaţiile şi sugestiile primite au servit la completarea şi îmbunătăţirea textului iniţial, în măsura în care ele corespundeau normelor internaţionale existente.

Textul revizuit este publicat acum şi supus aprecierii unui cerc cît mai larg de biochimişti, cu rugămintea ca eventualele observaţii şi propuneri să fie comunicate redacţiei acestei reviste, în vederea elaborării textului final.

Trebuie subliniat că propunerile colectivului se referă numai la clasele de substanţe mai larg întîlnite în lucrările de biochimie şi pentru care există recomandări sau norme general adoptate în literatura biochimică mondială.

De asemenea, tot după sursele indicate mai sus, sînt prezentate propuneri referitoare la redarea prescurtată a unor denumiri biochimice uzuale.

În sfîrşit, colectivul a socotit că odată cu recomandările de nomenclatură şi abrevieri este util să se atragă atenţia biochimiştilor români şi asupra normelor internaţionale privitoare la simbolurile unităţilor de măsură şi la notarea multiplilor şi fracţiilor acestora, ţinînd seama de faptul că şi în această materie se mai întîlnesc adeseori, în lucrările prezentate pentru publicare, destule şovăiri sau abateri.

GLUCIDE ŞI GLICOZIDE

Termenul *glucide* (sing. *glucid*) se va utiliza, cu precădere, pentru a desemna compuşii glucidici propriu-zişi, în timp ce termenul *glicozide* (sing. *glicozid*) va fi rezervat pentru substanţele eterologe, în care există

legături glicozidice între monomeri sau între părţile glucidice şi cele neglucidice ale moleculei. În particular, compuşii glicozidici ai glucozei se vor denumi cu termenul *glucozide* (sing. *glucozid*).

Se va renunţa la termenii zaharuri, carbohidraţi, hidraţi de carbon etc.

Pentru a denumi diferitele clase de glucide se recomandă termenii de tipul *monoglucide* (ca D-glucoza, D-fructoza, L-xiloza etc.), *diglucide* (ca zaharoza, pentru care *nu* se va folosi şi denumirea sucroză), *poliglucide* (cum sînt pentozanii, glucozanii, fructozanii etc.). Denumirile mai vechi monozaharide, dizaharide, polizaharide nu se recomandă, dar sînt tolerate.

Indicarea structurii

Pentru a indica izomeria sterică (filiaţia cu aldehida glicerică) se vor folosi capitalele italice mici („capităluţe") D şi L.

Indicarea puterii rotatorii reale se va face folosind simbolurile : (+) pentru *dextro-*, (−) pentru *levo-* şi (±) pentru *racemic*. Se va renunţa la utilizarea literelor *d*, *l* şi *dl*.

Notaţiile *p* şi *f* pentru forma piranozică şi cea furanozică, notaţiile D şi L pentru indicarea stereoizomeriei şi prefixele anamerice se vor utiliza, în simboluri, sub următoarele forme :

unitatea α-D-glucopiranozică ; α-D-Glc*p* sau Glc*p*,
unitatea β-D-fructofuranozică : β-D-Fru*f* sau Fru*f*

În asemenea simboluri legăturile sînt notate prin cratime, iar poziţia şi natura lor sînt indicate prin cifre şi prin simbolurile anamerice α şi β :

maltoza : Glc*p* α 1 — 4 Glc,
lactoza : Gal*p* α 1 — 4 Glc
stachioza : Gal*p* α 1 — 6 Gal*p* α 1 — 6 Gal*p* α 1 — 2 βFru*f*

Cînd este necesar să se sublinieze direcţia legăturii ozidice, se poate folosi o săgeată ce porneşte de la atomul de carbon semiacetalic al legăturii :

lactoza : Gal*p* α 1 → 4 Glc

LIPIDE

Lipide derivate de la glicerol

În nomenclatura acestor lipide se ţine seama de configuraţia sterică a derivaţilor glicerolului. Aceasta se precizează prin aşa-numita *numerotare stereospecifică* (stereospecific numbering : *sn*) a celor trei atomi de carbon ai glicerolului, aplicată în felul următor la formula acestuia, scrisă în proiecţia Fischer, cu gruparea hidroxil secundară spre stînga :

$$\begin{array}{lll} CH_2OH & & (1) \\ | & & \\ HO-C-H & & (2) \\ | & & \\ CH_2OH & & (3) \end{array}$$

Utilizarea numerotării stereospecifice la denumirea derivaţilor glicerolului, a căror configuraţie sterică este cunoscută, se indică prin prefixul

sn (cules la tipar cu litere italice), pus înaintea termenului „glicerol", respectiv „glicero-", şi separat de acesta printr-o cratimă. Astfel, cei doi esteri monofosforici stereoizomeri ai glicerolului obţinuţi prin substituţia cîte uneia din grupările hidroxil primare ale acestuia se denumesc : acidul *sn*-glicero-1-fosforic, respectiv acidul *sn*-glicero-3-fosforic. Cînd însă substituţia are loc la gruparea hidroxil secundară, prefixul *sn* nu mai este necesar, deoarece în acest caz nu mai sînt posibili stereoizomeri : acidul glicero-2-fosforic.

În cazul unui amestec în părţi egale al celor doi antipozi optici se va utiliza prefixul *rac-* (= racemic), iar cînd configuraţia sterică este necunoscută sau nespecificată, se va utiliza prefixul *X* — :

rac-1-hexadecilglicerol,

X-glicero-1,2,-dipalmitat-3-stearat

Termenul *fosfogliceríd* (pl. *fosfogliceride*) va fi utilizat pentru a desemna orice derivat al unui acid glicerofosforic care mai conţine cel puţin o grupare 0-acil sau 0-alchil sau 0-alc-1-en-1'-il (adică R—CH=CH—) legată de restul gliceric. Dacă gruparea astfel legată este cunoscută, numele ei poate fi pus înaintea termenului generic fosfoglicerid :

colin-fosfoglicerid

Prin termenul generic *acid fosfatidic* se desemnează acei derivaţi ai acizilor glicero-monofosforici, în care celelalte două grupări hidroxil ale glicerolului sînt esterificate cu acizi graşi.

Termenul lecitină este tolerat, dar nu recomandat, pentru desemnarea compuşilor de tipul 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosforilcolinei. Pentru compuşii de acest tip este recomandat termenul generic 3-*sn*-*fosfatidilcolină*.

În locul denumirilor uzuale triglicerid, diglicerid, se recomandă denumirile *triacilglicerol*, *diacilglicerol*.

Sfingolipide

Compusul denumit în trecut dihidrosfingozină (2D-aminooctadecan-1,3D-diol sau D-eritro-2-aminooctadecan-1,3-diol sau (2S, 2R)-2-aminooctadecan-1,3-diol) se va numi *sfinganină*.

Această denumire poate fi modificată prin prefixe care indică noi substituenţi sau omologi superiori sau inferiori. Prefixele pentru desemnarea omologilor se derivă suprimînd litera terminală „n" din numele sistematic al hidrocarburilor care au acelaşi număr de atomi de carbon ca bazele respective cu catenă lungă (înţelegînd prin „bază cu catenă lungă" sfinganina, omologii şi stereoizomerii ei, precum şi hidroxiderivaţii şi derivaţii lor nesaturaţi).

Denumirile compuşilor parţial nesaturaţi se derivă din acelea ale compuşilor saturaţi corespunzători, prin terminaţii ce indică nesaturarea : en, dien, in etc. Dubla legătură este presupusă a avea orientarea *trans* a catenei de carbon. Dacă însă orientarea este *cis* sau necunoscută, acest fapt se indică prin prefixul *cis-*, respectiv *X-*, plasat înaintea numărului care precizează poziţia dublei legături :

4-sfingenină (în locul vechii denumiri sfingozină)

cis-4-sfingenină (izomerul geometric al 4-sfingeninei).

Utilizarea denumirii uzuale sfingozină este totuşi tolerată. Denumirile uzuale ale celorlalţi compuşi vor fi însoţite însă totdeauna, în textul

respectiv, la prima lor menţionare, de denumirea corespunzătoare normelor de nomenclatură de mai sus sau acelora ale nomenclaturii generale din chimia organică.

Prin termenii generici de mai jos se desemnează următoarele grupe de compuşi :

sfingolipid : orice lipid care conţine o bază cu catenă lungă (v. mai sus definiţia acesteia) ;

glicosfingolipid : orice lipid care conţine o bază cu catenă lungă şi unul sau mai multe glucide ;

ceramid : orice derivat N-acil al unei baze cu catenă lungă ;

cerebrozid : orice monoglicozilceramid ;

sfingomielină : orice ceramid-1-fosforilcolină.

Fosfolipide şi fosfoinozitide

Prin termenul *fosfolipid* se desemnează orice lipid care conţine un radical derivat de la acidul fosforic.

Prin termenul *fosfoinozitid* se desemnează orice lipid care conţine radicali derivaţi de la inozitol şi de la acidul fosforic.

AMINOACIZI

Se va evita transcrierea numelui aminoacizilor (*nu* „amino-acizilor") în moduri ce nu corespund regulilor ortografiei române, ca : methionină, tryptofan, lysină etc. Se va scrie : metionină, triptofan, lizină etc.

Dintre denumirile paralele acid aspartic — acid asparagic şi glicină — glicocol, ambele uzitate, se recomandă primele : acid aspartic, glicină.

VITAMINE

Denumiri uzuale	*Denumiri recomandate*
vit. A_1, axeroftol	retinol
retinen	retinal
acidul vitaminei A	acid retinoic
vit. A_2	dehidro-3-retinol, dehidroretinol
retinen 2	dehidro-3-retinal, dehidroretinal
vit. D_2, calciferol	ergocalciferol
vit. D_3	colecalciferol
vit. E	α-tocoferol
	β-tocoferol
	γ-tocoferol
vit. K_1 2-metil-fitil-3-naftochinonă 1—4	filochinonă
vit. K_2, farnezil-2-metil-3-naftochinonă 1—4	farnochinonă
vit. B_1, aneurină, tiamină	tiamină
vit. B_2, riboflavină	riboflavină
vit. B_6, piridoxină	piridoxină, indicînd grupul derivaţilor piridinici existenţi în natură şi dotaţi cu activitate vitaminică B_6
vit. PP, niacinamidă, nicotinamidă	nicotinamidă
acid pantotenic	acid pantotenic
biotină	biotină
mezoinozitol	mezoinozitol

acid p-aminobenzoic	acid p-aminobenzoic
vit. B_c, acid folic, folacină	acid pteroil-monoglutamic
colină	colină
vit. B_{12}	cian-cobalamidă
vit. B_{12b}	hidroxi-cobalamidă
vit. B_{12c}	nitrit-cobalamidă
vit. C, acid ascorbic	acid ascorbic

ENZIME

Pentru enzime se vor utiliza denumirile din clasificarea internaţională a enzimelor (Enzyme Nomenclature, 1965, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, London, New York).

La prima menţionare în text a unei enzime, numele ei va fi însoţit, neapărat, de numărul corespunzător din tabela de clasificare internaţională a enzimelor :

L-arginază (E.C.3.5.3.1)

În cazuri particulare este tolerată şi folosirea unor denumiri uzuale, nerecomandate (ca fibrinolizină, colagenază etc.), indicînd însă la prima lor menţionare în text denumirea oficială recomandată şi numărul respectiv din clasificarea internaţională.

Dehidrogenazele, oxidazele (acceptor oxigenul), reductazele

Acestea se denumesc indicîndu-se mai întîi compusul asupra căruia se exercită acţiunea enzimei, apoi, separat printr-o cratimă, tipul de enzimă :

lactat-dehidrogenază (E.C.1.1.1.27),
glucoz-oxidază (E.C.1.1.3.4),
glutation-reductază (E.C.1.6.4.2).

Nu se va scrie lactatdehidrogenază, nici lactat dehidrogenază, şi nici nu se vor folosi denumiri de tipurile lacticodehidrogenază, dehidrogenază lactică etc.

Hidroxilazele

Acestea se denumesc după aceleaşi reguli ca mai sus :

colesterol-20-hidroxilază (E.C.1.14.1.9)

Transferazele

Acestea se denumesc indicîndu-se mai întîi compusul acceptor, apoi compusul donor al grupării transferate :

ornitin-carbamoil-transferază (E.C.2.1.3.3).

În cazul special al *fosfo-transferazelor*, care transferă gruparea fosfat de pe ATP pe un acceptor şi se numesc *kinaze*, se indică, în prefix, numai acceptorul grupării fosfat :

hexokinază (E.C.2.7.1.1).

Pentru *nucleotidil-transferaze* se recomandă următoarele :

Ribonucleaza (E.C.2.7.7.17) se va denumi, de preferinţă, prin acest nume întreg. Folosirea prescurtării uzuale RNază este totuşi tole-

rată, cu condiţia ca semnificaţia ei să fie indicată la prima menţionare în text.

Se vor evita însă denumirile RNA-polimerază şi DNA-polimerază, folosite adeseori pentru *RNA-nucleotidil-transferază* (E.C.2.7.7.6), respectiv pentru *DNA-nucleotidil-transferază* (E.C.2.7.7.7).

Hidrolazele

Pentru *deoxiribonucleză* (E.C.3.1.4.5) şi pentru *deoxiribonucleaza* II (E.C.3.1.4.6) se fac aceleaşi recomandări ca pentru ribonucleză (v. mai sus Transferazele).

Se recomandă evitarea denumirilor uzuale lecitinază A şi lecitinază B. Pentru cea dintîi se va folosi denumirea *fosfolipază A* (E.C.3.1.1.4), iar pentru cea de-a doua denumirile *fosfolipază B* sau *lipo-fosfolipază* (E.C.3.1.1.5).

Esterazele

Acestea se denumesc indicîndu-se, ca prefix, substratul lor :

colin-esterază (E.C.3.1.1.8).

Fosfatazele

Pentru cele *nespecifice* se vor folosi denumirile uzuale *fosfatază alcalină* (E.C.3.1.3.1), respectiv *fosfatază acidă* (E.C.3.1.3.2).

Cele *specifice* se denumesc indicîndu-se, mai întîi, substratul corespunzător :

fosfoserin-fosfatază (E.C.3.1.3.3).

Glucozidazele

În locul denumirilor uzuale—maltază, lactază, zaharază — se recomandă următoarele :

β-glucozidază (E.C.3.2.1.20),
β-galactozidază (E.C.3.2.1.23),
β-fructofuranozidază (E.C.3.2.1.26).

Peptidazele

Se recomandă evitarea denumirii uzuale colagenază, înlocuind-o cu aceea de *clostridio-peptidază A* (E.C.3.4.4.19). De asemenea, în locul denumirii uzuale fibrinolizină, se recomandă aceea de *plasmină* (E.C.3.4.4.14).

Deaminazele

În locul termenilor uzuali adenază şi guanază se recomandă denumirile *adenin-deaminază* (E.C.3.5.4.2), respectiv *guanin-deaminază* (E.C.3.5.4.3).

Izomerazele

Acestea se denumesc indicîndu-se, mai întîi, substratul lor : glucuronat-izomerază (E.C.5.3.1.12).

Sintetazele

Acestea se denumesc indicîndu-se, mai întîi, compusul ce rezultă din procesul de sinteză :

glutation-sintetază (E.C.6.3.2.3).

Forme multiple ale enzimelor

În cazul enzimelor, denumirea *forme multiple* se va folosi, în sens larg, pentru a desemna toate proteinele ce posedă aceeaşi activitate enzimatică şi apar la o aceeaşi specie.

Deşi denumirea *izoenzime* este rezervată acelor forme multiple între care există deosebiri de structură primară, genetic determinate, nu însă şi acelora care derivă prin modificarea unei aceleiaşi secvenţe primare, ea se foloseşte totuşi, curent, pentru a desemna enzimele cu activitate catalitică de acelaşi tip, dar care se pot diferenţia prin indici fizico-chimici cum sînt mobilitatea electroforetică, termostabilitatea etc. Individualizarea lor se va face potrivit următoarelor recomandări :

1. Se indică numele enzimei respective, urmat de un număr care ilustrează mobilitatea ei electroforetică, numărul 1 fiind dat formei cu mobilitatea cea mai mare în raport cu anodul (în fotografii sau diagrame acesta se consideră orientat spre partea de sus, respectiv spre dreapta paginii).

2. Dacă în imagine apar complexe de izoenzime cu grupe majore, fiecare avînd zone electroforetice diferite, se vor numerota ca mai sus aceste grupe majore, iar subzonele individuale se vor indica prin litere mici ale alfabetului latin, plasate mai jos, în dreapta numărului respectiv : 1_a, 1_b ... 2_a, 2_b ...

3. Pentru a evita orice posibilitate de confuzie, individualizarea izoenzimelor se poate face, la nevoie, indicîndu-se şi alţi parametri, ca masa moleculară, termostabilitatea, prezenţa unor subunităţi (notate cu litere eline).

SUBSTANŢE MARCATE RADIOACTIV

Pentru desemnarea acestor substanţe se va folosi, ca prefix, simbolul izotopului de marcare, menţionînd, dacă este cazul, şi poziţia sa în moleculă:

^{14}C-uree
acid $^{14}C_2$-glicolic
acid iodo-$^{14}C_2$-acetic
acid ^{125}I-iodoacetic
^{131}I-albumină

Pentru a specifica modalitatea de marcare radioactivă, se folosesc simbolurile U pentru „uniform" şi G pentru „general", incluse într-o paranteză dreaptă împreună cu simbolul izotopului de marcare :

[U—^{14}C]-glucoză (simbolizează molecula de glucoză marcată cu ^{14}C uniform distribuit între toate cele şase poziţii),
[G—^{14}C]-glucoză (simbolizează molecula de glucoză marcată cu ^{14}C la toate cele şase poziţii, dar fără o distribuţie uniformă).

Pentru indicarea activităţii specifice se vor utiliza multipli sau submultipli de Curie, raportaţi la subunitatea adecvată de masă sau de cantitate de substanţă :

25 mCi/mg,
500 mCi/mmol.

PRESCURTĂRI ŞI SIMBOLURI

Ca regulă generală, pentru desemnarea unităţilor monomere (monoglucide, aminoacizi, nucleozide) ale macromoleculelor (poliglucide, proteine, polinucleotide) se folosesc *simboluri* :

Gly-Val-Thr pentru tripeptidul glicil-valil-treonină

Pentru desemnarea unor compuşi cu alcătuire mai complexă, şi anume atunci cînd în textul respectiv nu este necesară scoaterea în evidenţă a structurii compusului în cauză, se folosesc *prescurtări* ale denumirilor lor comune:

ADP pentru adenozin-5′-difosfat

Dacă însă textul insistă asupra unor caractere structurale, se recomandă să se folosească drept notaţie abreviată *simboluri sistematice* :

Ado-5′-PP în loc de ADP.

În cele ce urmează se dă o listă a simbolurilor şi prescurtărilor celor mai frecvent utilizate în biochimie, pe plan internaţional, cu menţiunea că multe din ele derivă din denumirile engleze ale compuşilor respectivi şi au apărut pentru prima dată în texte publicate în limba engleză. Ele vor fi utilizate în forma dată mai jos, aprobată de forurile internaţionale de specialitate, aşa cum se procedează curent şi în cazul simbolurilor elementelor chimice. Se recomandă, aşadar, să se evite încercările de a româniza simbolurile internaţionale, scriind, de exemplu, ARN în loc de RNA, pentru acidul ribonucleic, sau Lis în loc de Lys, pentru lizină etc.

La nevoie se pot utiliza şi alte simboluri, încă neaprobate de forurile internaţionale. Semnificaţia lor va trebui să fie specificată neapărat la prima lor menţionare în text.

Ionii

Elementele sau radicalii ionizaţi se vor reprezenta cu respectarea regulilor generale de valenţă : Na^{+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}, Cl^{-}, SO_4^{2-} etc. Nu se recomandă notaţiile de tipul Zn^{++}, SO_4^{--} etc.

Gruparea fosfat

Aceasta se indică prin P, specificîndu-se eventual poziţia în care ea este ataşată (în cazul simbolurilor sistematice) :

Glc-6-P sau G-6-P pentru glucozo-6-fosfat.

Se mai folosesc şi următoarele notaţii :

P_i — ortofosfat anorganic

PP_i — pirofosfat anorganic

Glucide şi derivaţi

de	— deoxi,	GlcNAc	— N-acetilglucozamină,
f	— furanoză (ca sufix),	GlcUA	— acid glucuronic,
Fru	— fructoză,	Man	— manoză,
Gal	— galactoză,	p	— piranoză (ca sufix),
Glc, G *)	— glucoză,	Rib	— riboză,
Glc-6-P, G-6-P	— glucozo-6-fosfat,	deRib	— deoxiriboză
GlcA	— acid gluconic,		
GlcN	— glucozamină,		

Aminoacizi şi derivaţi

Aad	— acid 2-aminoadipic,	$Glu(NH_2)$, Gln	— glutamină,
βAad	— acid 3-aminoadipic,	Gly	— glicină (glicocol),
Abu	— acid 2-aminobutiric,	GSH	— glutation,
A_2bu	— acid 2,4-diaminobutiric,	GSSG	— glutation oxidat,
Ala	— alanină,	Hcy	— homocisteină,
βAla	— β-alanină,	His	— histidină,
Apm	— acid aminopimelic,	Hse	— homoserină,
A_2pm	— acid 2,2′-diaminopimelic,	Hyl	— hidroxilizină,
A_2pr	— acid 2,3-diaminopropionic,	Hyp	— hidroxiprolină,
Arg	— arginină,	Ile	— izoleucină,
Asp	— acid aspartic (asparagic),	Leu	— leucină,
$Asp(NH_2)$, Asn	— asparagină,	Lys	— lizină,
Cys	— cisteină,	Met	— metionină,
Cys_2	— cistină,	Nle	— norleucină,
DOPA	— 3,4-dihidroxifenilalanină,	Nva	— norvalină,
Glu	— acid glutamic,	Orn	— ornitină,
		Phe	— fenilalanină,
		Pro	— prolină,
		Ser	— serină,
		Thr	— treonină,
		Trp	— triptofan,
		Tyr	— tirozină,
		Val	— valină

Cromoproteide

Hb	— hemoglobină,	MbCO	— carboximioglobină,
HbCO	— carboxihemoglobină,	MbO_2	— oximioglobină,
HbO_2	— oxihemoglobină,	MetHb	— methemoglobină,
Mb	— mioglobină,	MetMb	— metmioglobină.

Purine şi pirimidine

Ade	— adenină,	Thy	— timină,
Cyt	— citozină,	Ura	— uracil.
Gua	— guanină,		

*) Simbolul G se va folosi pentru glucoză numai dacă în aceeaşi lucrare nu se discută şi despre guanozină, care de asemenea poate fi reprezentată prin acest simbol.

Acizi nucleici

DNA	— acid deoxiribonucleic,	nRNA	— acid ribonucleic nuclear,
mtDNA	— acid deoxiribonucleic mitocondrial,	rRNA	— acid ribonucleic ribozomal,
RNA	— acid ribonucleic,	sRNA	— acid ribonucleic solubil,
cRNA	— acid ribonucleic complementar,	tRNA	— acid ribonucleic de transfer.
mRNA	— acid ribonucleic mesager,		

Nucleozide

Ado, A	— adenozină,	Thd, T	— riboziltimidină,
Cyd, C	— citidină,	Urd, U	— uridină,
Guo, G*)	— guanozină,	Xao, X	— xantozină.
Ino, I	— inozină,		

Pentru deoxiribonucleozidele corespunzătoare se adaogă simbolului respectiv prefixul „de" atunci cînd se foloseşte simbolul „lung" (deAdo, deCyd etc.), dar prefixul „d" cînd se foloseşte simbolul abreviat (dA, dC etc.).

Nucleotide

AMP	— adenozin-5′-monofosfat,	GDP	— guanozin-5′-difosfat,
ADP	— adenozin-5′-difosfat,	GTP	— guanozin-5′-trifosfat,
ATP	— adenozin-5′-trifosfat,	IMP	— inozin-5′-monofosfat,
CMP	— citidin-5′-monofosfat,	IDP	— inozin-5′-difosfat,
CDP	— citidin-5′-difosfat,	ITP	— inozin-5′-trifosfat,
CTP	— citidin-5′-trifosfat,	UMP	— uridin-5′-monofosfat,
GMP	— guanozin-5′-monofosfat,	UDP	— uridin-5′-difosfat,
		UTP	— uridin-5′-trifosfat,
		UDPG	— uridin-5′-difosfat-glucoză.

Coenzime

CoA, CoASH	— coenzima A	NAD, $NADH_2$	— nicotinamidadenin-dinucleotid (oxidat şi redus),
CoASAc, acetil-CoA	— acetil-coenzima A,	NADP, $NADPH_2$	— nicotinamidadenin-dinucleotid-fosfat (oxidat şi redus),
DPT	— difosforiltiamină (pirofosfat de tiamină, cocarboxilază)	NMN	— nicotinamid-mononucleotid.
FAD, $FADH_2$	— flavinadenin-dinucleotid (oxidat şi redus),		
FMN	— flavin-mononucleotid (riboflavin-5′-monofosfat),		

*) Simbolul G se va folosi pentru guanozină numai dacă în aceeaşi lucrare nu se discută şi despre glucoză, care de asemenea poate fi reprezentată prin acest simbol.

Derivaţi de celuloză utilizaţi în cromatografie

CM-celuloză	— O-(carboximetil)-celuloză,	TEAE-celuloză	— O-(trietilaminoetil)-celuloză,
DEAE-celuloză	— O-(dietilaminoetil)-celuloză,		

Diverse

BAL	— 2,3-dimercaptopropanol,	DNP	— 2,4-dinitrofenol,
		DTNB	— 5,5′-ditio-bis (2-nitrobenzoat),
DANS-Cl	— clorură de 1-dimetilamino-5-sulfonilnaftalen	EDTA	— etilen-diamin-tetraacetat,
DDT	— 1,1,1,-triclor-2,2-bis(p-clorofenil)-etan,	PTH	— feniltiohidantoină,
		Tris	— tris-(hidroximetil)-aminometan; sinonim: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propandiol.
DFP	— diizopropil-fluorofosfat,		
DNFB	— 2,4-dinitro-1-fluorobenzen,		

UNITĂŢI PENTRU EXPRIMAREA DIFERITELOR MĂRIMI

Pentru unificarea modului de exprimare a mărimilor de lungime, masă, timp, curent electric etc., cea de-a XI-a Conferinţă Generală de Măsuri şi Greutăţi şi Organizaţia Internaţională de Standardizare au adoptat, în 1960, un sistem internaţional de unităţi.

Pentru domeniul biochimiei, acest sistem a fost adaptat şi detaliat de către Comisia de Chimie Clinică a IUPAC, în 1966. El a fost adoptat şi în ţara noastră şi este redat mai jos.

Mărimea	*Unitatea*	*Simbolul*
	Unităţi de bază	
lungime	metru	m
masă	kilogram	kg
timp	secundă	s
curent electric	amper	A
temperatură termodinamică	grad Kelvin	K
intensitate luminoasă	candelă	cd
cantitate de substanţă	mol	mol
	Unităţi derivate	
suprafaţă	metru pătrat	m^2
volum	metru, cub, litru	m^3,l
densitate	kilogram pe metru cub	$kg\ m^{-3}$
viteză	metru pe secundă	ms^{-1}
viteză unghiulară	radian pe secundă	$rad\ s^{-1}$
coeficient de difuzie	metru pătrat pe secundă	$m^2\ s^{-1}$
luminiscenţă	candelă pe metru pătrat	$cd\ m^{-2}$
acceleraţie	metru pe secundă pătrată	$m\ s^{-2}$
energie	joule	$J, kg\ m^2\ s^{-2}$
forţă	newton	$N, kg\ m\ s^{-2} = J\ m^{-1}$
putere	watt	$W, kg\ m^2\ s^{-3} = J\ s^{-1}$
sarcină electrică	coulomb	C, A s
diferenţă de potenţial electric	volt	$V, kg\ m^2\ s^{-3}A^{-1} = J\ A^{-1}\ s^{-1}$
rezistenţă electrică	ohm	$\Omega, kg\ m^2\ s^{-3}\ A^{-2} = V\ A^{-1}$
capacitanţă electrică	farad	$F, A^2\ s^4\ kg^{-1}\ m^{-2} = A\ s\ V^{-1}$
flux magnetic	weber	$Wb, kg\ m^2\ s^{-2}\ A^{-1} = V\ s$

inductanță	henry	H, kg m^2 s^{-2} A^{-2} = V s A^{-2}
densitate de flux magnetic	tesla	T, kg s^{-2} A^{-1} = V s m^{-2}
flux luminos	lumen	lm = cd sr m^{-2}
iluminare	lux	lx = cd sr m^{-2}
frecvență	hertz	Hz, s^{-1}
presiune	newton pe metru pătrat	N m^{-2}
viscozitate de scurgere	newton-secundă pe metru pătrat	N s m^{-2}
cîmp electric	volt pe metru	V m^{-1}
cîmp magnetic	amper pe metru	A m^{-1}
conductivitate termică	watt pe metru-grade Kelvin	W $m^{-1}K^{-1}$
tensiune de suprafață	newton pe metru	N m^{-1}

Prefixe și simboluri pentru multiplii și fracțiile unităților

10^3	kilo-	k	10^{-3}	mili-	m
10^6	mega-	M	10^{-6}	micro-	μ
10^9	giga-	G	10^{-9}	nano-	n
10^{12}	tera-	T	10^{-12}	pico-	p
			10^{-15}	femto-	f
			10^{-18}	atto-	a

Noțiuni, unități și simboluri privitoare la funcționalitatea enzimelor

Unitatea enzimatică (U) este cantitatea de enzimă care, în condiții standard definite, catalizează transformarea unui micromol de substrat pe minut.

Concentrația unei enzime în soluție se exprimă în unități pe unitatea de volum (U/l, U/ml).

Activitatea specifică a unei enzime se exprimă în unități pe miligram de proteină (U/mg).

Constanta de disociere sau *constanta de substrat* se notează K_s.

Constanta Michaelis se notează K_m și se definește ca reprezentînd acea concentrație a substratului, la care viteza v a reacției este egală cu jumătate din viteza maximă V de transformare a sa : $v = V/2$.

Recomandări privind utilizarea simbolurilor de unități internaționale

Mărimea	*Notații recomandate*	*Notații nerecomandate*
ungime	m, mm, μm, nm	cm, μ, mμ
suprafață	m^2, mm^2, μm^2	cm^2, μ^2
volum	m^3, cm^3, mm^3	cc, cmc, μ^3
	l, ml, μl, nl, pl, fl	λ, μμl
masă	kg, g, mg, μg, ng, pg	Kg, gm, gm., gr, gr., mμg μμg
densitate	kg/l, g/l, mg/l	g/ml, mg/ml, μg/ml
timp	s, Ms, ks, ms	s., sec, sec.
	min	min., m
	h	h.
cantitate de substanță	mol, mmol, μmol	M, eq, val, g-mol
cantitate de enzimă	U, mU, μU	mmol/min
molaritate (concentrație)	M, mol//l	m, mmol/mg
	mM, mmol/l, 10^{-3}M	
	μM, μMol/l, 10^{-6}M	
concentrație de substanță	kg/l, g/l, mg/l	g%, mg%
substanță	g/ml, mg/ml	
concentrație de enzimă	U/l, kU/l, mU/l U/ml	μmol/min/ml
activitate radioactivă specifică	Ci mol^{-1}	

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 1, 57–63 (1975)

Amino acids, peptides and proteins. Biochemical and immunochemical techniques in protein chemistry (Aminoacizi, peptide şi proteine. Tehnici biochimice şi imunochimice în chimia proteinelor) T. Dévényi, J. Gergely, Akadémiai Kiadó. Budapesta, 1974, 343 pag.

În această carte sînt prezentate principiile celor mai importante metode biochimice de analiză a proteinelor, aplicabile în laboratoare cu o aparatură obişnuită, se arată materialele şi echipamentul necesar şi se descriu amănunţit aceste procedee precum şi unele metode imunochimice.

Primul capitol cuprinde o discuţie teoretică a tuturor metodelor prezentate în acest volum. Următoarele două capitole se ocupă de electroforeza proteinelor, glico- şi lipoproteinelor la voltaj scăzut, mediu şi înalt. Capitolul IV prezintă cele mai utilizate metode imunochimice, calitative şi cantitative. Hidroliza acidă şi enzimatică a proteinelor este descrisă în capitolul V. Capitolul VI este destinat laboratoarelor înzestrate cu aparatură automată pentru determinarea aminoacizilor. Următoarele cinci capitole tratează pe larg analiza cromatografică pe hîrtie, schimbători de ioni şi gel de Sephadex a aminoacizilor, peptidelor şi proteinelor. Ultimul capitol prezintă metode de analiză a grupelor terminale şi de determinare a secvenţei de aminoacizi, prin degradarea în etape a peptidelor şi proteinelor. Cartea se încheie cu un appendix, în care se descriu principiul, metodele şi aparatura necesară analizei gaz-cromaografice a aminoacizilor.

Numărul mare de tehnici cu indicaţii de lucru exacte, discutarea avantajelor şi desavantajelor acestor tehnici şi bibliografia bogată fac ca această carte să fie utilă nu numai cercetătorilor ci şi laboratoarelor medicale de rutină.

Elena Ganea
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti

P. JOLLES, A. PARAF, *Chemical and Biological Basis of Adjuvants* (Bazele chimice şi biologice ale adjuvanţilor), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, 153 pag., 24 fig.

Volumul 13 din seria Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics este o punere la punct a aspectelor chimice şi biologice ale adjuvanţilor imunologici.

Materialul tratat pe întinsul a şase capitole, cu un bogat material bibliografic, este repartizat astfel : capitolul I se ocupă de substanţele ce au efect adjuvant (pereţii celulari ai micobacteriilor, cerurile D din micobacterii, fracţiunile hidrosolubile din micobacterii), apoi de substanţe cu acţiune adjuvantă (produse microbiene, acizi nucleici etc.) ca şi de substanţe ce pot avea acţiune adjuvantă (bacterii grampozitive, substanţe fungicide, viruşi etc.). În capitolul II se face un studiu detaliat al cerurilor D şi al fracţiunilor din micobacterii ce au acţiune adjuvantă. Capitolul III prezintă pe larg corelaţia dintre structura chimică şi acţiunea adjuvantă. Capitolul IV se ocupă de activitatea biologică a adjuvanţilor (asupra răspunsului imun primar şi secundar, reacţiilor anafilactice, toleranţei, hipersensibilităţii întîrziate, creşterii tumorale şi reacţia grefei, inducerii de plasmocitoame şi a interferonului). În capitolul V se trec în revistă macanismele activităţii adjuvanţilor. Capitolul VI se ocupă de aspectele aplicative (producerea de seruri terapeutice, folosirea adjuvanţilor în imunizarea activă a omului şi animalelor teste pentru studiul unui adjuvant etc.).

Bogatul şi documentatul material adunat în acest volum este de un real folos atît pentru imunologul ce-l va parcurge, cît şi pentru medicul sau biologul interesat de aspectele imunologice ale folosirii adjuvanţilor.

Ion Boroş
Institutul de fiziologie
Bucureşti

Textbook of physiology and biochemistry (Manual de fiziologie şi biochimie) de George N. Bell, J. Norman Davidson şi Donald Emslie-Smith Ediţia VIII-a Churchill Livingstone, Londra, 1972, 1160 p

Fiziologia şi biochimia deşi au acelaşi obiectiv continuă să rămînă discipline distincte nu atît prin instrumentele cu care lucrează fiecare ci mai mult din cauza imperfecţiunii şi limitele acestora. Expansiunea considerabilă din ultimii ani a cunoştinţelor privitoare la materia vie impun o modificare a metodelor de predare a acestor discipline. De la analiza detaliată a constituenţilor organismelor vii şi a reacţiilor enzimatice izolate, biochimia trece la integrarea activităţilor metabolice tinzînd să devină funcţională. Pe de altă parte, fiziologia de la cercetarea organismului întreg şi a organelor intacte pătrunde cu analiza fenomenelor pînă la nivel celular şi molecular. Aceste tendinţe convergente fac ca domeniile biochimiei şi fiziologiei să se interpătrundă pe arii din ce în ce mai întinse şi separarea lor să devină arbitrară. Acest manual, la cea de a opta ediţie a sa, reprezintă un efort de fuziune a fiziologiei şi a biochimiei. Expunerea clară şi concisă, fac din acest volum un ajutor preţios pentru studenţii în medicină, biologie sau biochimie.

Elena Cristea
I.M.F. Bucureşti

Current topics in microbiology and immunology (Tematici actuale în microbiologie şi imunologie), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, vol. 60, 16 fig., 197 p.; vol. 61, 24 fig., 211 p

Cele patru lucrări incluse în volumul 60 abordează diferite aspecte de interes general din domeniul imunologiei. Sînt dezbătute probleme legate de rolul fierului în infecţiile bacteriene semnalate la nivelul fluidelor umorale sau al ţesuturilor, de histocompatibilitatea antigenelor, de blocarea nespecifică sau de inhibiţia specifică a procesului de recunoaştere, de genetica factorilor ce intervin în determinarea sexului la Enterobacteriacee. Sînt descrise rezultatele studiilor fizice asupra acestor factori, ale studiilor fiziologice şi genetice privind incompatibilitatea şi replicarea DNA, sau conexiunea între factorii de sex. Un fenomen imunologic minuţios analizat este competiţia antigenică, autorii dezvăluind unele sisteme exprerimetale model ale competiţiei, aspecte practice ale fenomenului, teorii privind răspunsul imun.

Volumul 61 înmănunchiază tot patru lucrări, care tratează detaliat influenţa temperaturii mediului asupra răspunsului imun la peşti, rezistenţa lor imună la patogeni, mecanismul infecţiei la temperaturi joase, efectul depresiv al temperaturii ambiante la animalele poikiloterme, ontogenia răspunsului imun la vertebratele cu sînge rece, evoluţia capacităţii de producere a anticorpilor, implicarea timusului în mecanismele imunologice etc. Compoziţia de bază a DNA, decelată prin diferite metode (chimice, analize spectrale), la bacterii, drojdii şi Mycoplasma, se bucură de un capitol special. Menţionăm, de asemenea, aspectele care reliefează importanţa biologică a imunoglobulinelor legate de tumori, adsorbţia anticorpilor antitumoare de celulele tumorale, legarea nespecifică a imunoglobulinelor de aceste celule, precum şi degradarea provocată de enzimele lizozomale.

Ambele volume se caracterizează printr-o ţinută grafică ireproşabilă şi se încheie cu cîte un index de autori şi de subiecte.

Ioana Hagima
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice,
Bucureşti

G. PASTERNAK, U. SCHNEEWEISS, *Transplantations- und Tumorimmunologie* (Imunologia transplantului şi a tumorilor), editura VEB Gustav Fischer, Jena, 1973, 289 pagini, 45 figuri şi 16 tabele.

Prezenta monografie oferă o privire de ansamblu asupra metodelor folosite şi rezultatelor obţinute în imunologia transplanturilor şi a tumorilor, cu scopul de a scoate în relief, din noianul de date experimetale şi clinice, liniile principale de dezvoltare, de o importanţă deosebită pentru continuarea teoretică şi practică a celor două direcţii de cercetare. După ce, în

primul capitol, sînt expuse probleme legate de sistemele de histocompatibilitate, în capitolele următoare sînt prezentate diferite aspecte ale toleranţei imune şi imunologiei transplantărilor de organe la om, celula limfoidă reactivă şi importanţa timusului în fenomenele imunologice. În continuare sînt înfăţişate aspecte legate de imunosupresie prin seruri antilimfocite, în sisteme experimentale, structura antigenică a membranei celulare, izolarea şi proprietăţile antigenelor de transplant, antigenele în tumori induse chimic sau fizic, precum şi virusurile tumorale şi antigenele specifice ale tumorilor induse de virusuri. Un capitol consacrat căutării unor antigene în tumori umane încheie această monografie.

Materialul prezentat este bine sistematizat, iar numeoasele tabele, fotografii şi scheme ce-l ilustrează contribuie la mai buna înţelegere a problemelor tratate.

Horst D. Schell
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti

Functional Units in Protein Biosynthesis (Unităţi funcţionale implicate în biosinteza proteică) Al VII-lea Simpozion FEBS, Varna, Bulgaria, 1971. Ed. R. A. Cox, A.A. Hadjiolov. Academic Press, London, New York, 1972

Volumul de faţă reflectă preocuparea constantă a simpozionului pentru aspectul funcţional al diferitelor unităţi celulare — în sensul cel mai larg — implicate în biosinteza proteinelor; astfel, comunicările au fost repartizate pe următoarele secţiuni: I — Macromolecule implicate în sinteza proteică; II — Activarea aminoacizilor şi RNA de transfer; III — Integrarea şi funcţionarea aparatului de sinteză a proteinelor şi IV — Genetica şi biosinteza ribozomilor.

Comunicările semnate de autori şi colective de prestigiu sînt, de multe ori, treceri în revistă, priviri critice şi diferite asupra unor probleme identice sau înrudite, oferind astfel celor interesaţi un schimb fertil de opinii. Se remarcă, de asemenea, tendinţa de a corobora cel puţin pe linie de nomenclatură, descoperiri importante. Menţionăm şi preocuparea susţinută pentru organite şi procese specifice eukariotelor.

Se acordă o importanţă deosebită aspectelor care contribuie la elucidarea mecanismului de biosinteză proteică, printre care: integrarea structurală a ribozomilor, activarea aminoacizilor, interacţiile constituenţilor sintezei proteice în timpul iniţierii elongaţiei şi terminării lanţului polipeptidic, genetica şi formarea ribozomilor, precum şi interacţia lor cu RNA-mesager — totul în lumina relaţiei între structură şi funcţiune.

Volumul prezintă interes şi prin faptul că încearcă o sinteză între preocupările biochimiştilor, biologilor, microbiologilor şi geneticienilor.

Vl. Gheordunescu
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti

Experiments in Physiology and Biochemistry (Experienţe de fiziologie şi biochimie), Editor G. A. Kerkut, Vol. 6, Academic Press, London, New York, 1973, 317 p.

Volumul este un îndreptar util — atît studenţilor cît şi cercetătorilor — la realizarea unor experienţe specifice de fiziologie şi biochimie animală. Editorul precizează că în volum sînt incluse numai experienţe a căror efectuare necesită perioade lungi de timp.

Din articolele prezentate, sistematic expuse spicuim: *Determinarea concentraţiei osmotice a unor volume mici de fluid* (G. M. Coast); *Aminoacizii şi osmoreglarea* (Mary E. Clark); *Construcţia unui microrespirometru pentru determinarea vitezei respiratorii a ouălor şi embrionilor mici* (Soren Lovtrup); *Mioglobinele moluştelor* (K. R. H. Read, R. C. Terwlliger); *Folosirea filtrelor Millipori în experienţe de fiziologie şi biochimie* (J. H. Russel); *Electroimunodifuzia bidirecţională* (A. J. Crowle).

Articolele conţin detalii asupra animalelor, aparaturii, soluţiilor necesare etc.; ajutînd astfel cititorul în abordarea practică a experienţelor descrise.

Condiţiile grafice excelente şi bibliografia numeroasă completează conţinutul de înalt nivel ştiinţific al volumului de faţă.

Doina Popov
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti

Peptides 1972. Proceedings of the Twelfth European Peptide Symposium Reinhardsbrunn Castle, German Democratic Republic, September 1972. (Peptide 1972. Lucrările celui de al 12-lea Simpozion European de Peptide ţinut în septembrie 1972 la Castelul Reinhardsbrunn — R. D. G.). Editat de H. Hanson, H. D. Jakubke. North-Holland Publishing Company — Amsterdam, London, American Elsevier Publishing Company, New York, 1973, 470 p.

Volumul de faţă cuprinde cele 86 lucrări prezentate la Simpozionul din 1972, consacrat peptidelor.

Materialul este divizat în două părţi, potrivit tendinţelor moderne de cercetare: prima parte expune diferite metode de sinteză chimică a peptidelor, cea de-a doua parte tratează mecanismele moleculare de acţiune ale acestor substanţe complexe.

Autori din întreaga lume şi-au adus contribuţia în tratarea problemelor generale deosebit de interesante, dintre care amintim: importanţa peptidelor ca bioregulatori celulari, activarea unor grupări în anumite condiţii, sinteza peptidelor pe suporturi polimerice, eliberarea şi inactivarea lor în prezenţa enzimelor sau a inhibitorilor, interacţiunile receptor-efector etc. Alte lucrări sînt consacrate unor aspecte specifice: concepţii noi asupra mecanismelor moleculare de acţiune a hormonilor peptidici, dependenţa activităţii biologice a antibioticelor de structura lor, caracterizarea unor toxine şi antitoxine etc.

Toate lucrările (majoritatea în limba engleză, puţine în limba germană) sînt bogat ilustrate, încheindu-se fiecare cu cîte o amplă bibliografie.

Ioana Hagima
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti

ULRICH, LÜTTGE-Stofftransport der Pflanzen (Transportul substanţelor în plante), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, 280 p., 97 fig.

Volumul de faţă reprezintă o îmbinare modernă şi utilă între procesele fiziologice asociate transportului substanţelor în plante şi legităţile fizico-matematice potrivit cărora se desfăşoară aceste procese.

Materialul prezentat este sistematizat în 7 capitole, care tratează următoarele aspecte: fluxul de substanţe şi energie în plantele superioare; noţiuni asupra potenţialului chimic, electric, electrochimic, precum şi asupra potenţialului de membrană; consideraţiuni asupra peretelui şi membranei celulelor vegetale; prezentarea unor modele fiziologice simple ale transportului, substanţelor în plante. Ultimele capitole ale cărţii se referă la legătura dintre structura fină a citoplasmei şi funcţiile de transport ale celulei vegetale, reglarea metabolică a proceselor de transport, şi postulează modele ce explică transportul substanţelor în plante, pe distanţe scurte, medii şi lungi.

Actualitatea modului de abordare a problemelor de transport al substanţelor în plante, este ilustrată de numeroasele indicaţii bibliografice ce încheie fiecare din capitolele cărţii. Prezentarea sistematică a materialului şi grafica deosebită a cărţii fac din volumul de faţă un manual util studenţilor în biologie şi biofizică, precum şi fiziologilor vegetali.

Doina Popov
Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti
Departamentul de Biochimie

The ribonucleic acids (Acizii ribonucleici), editori R. P. Srewart şi D. S. Lethman, edit. Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1973, 267 pag., 56 fig.

Volumul sistematizează materia unui curs postuniversitar asupra acizilor ribonucleici şi este o lucrare de sinteză şi de informare. Problemele acizilor ribonucleici sînt expuse clar şi concis, dar şi complex, evidenţiindu-se legătura cu alte domenii adecvate.

Sînt trecute în revistă felurile de acizi ribonucleici, fiziologia şi biochimia lor. Capitolele mai importante, din punct de vedere al amploarei fenomenelor fiziologice, sînt tratate în mod atent, cu secţiuni critice speciale în care se discută argumentele pro şi contra, acolo unde cunoştinţele încă nu au ajuns la cristalizări teoretice. Se dau informaţii complete, lăsîndu-se cititorilor deplina autonomie în aprecieri.

Semnificative pentru buna organizare a materialelor sînt cele două indexuri: unul la sfîrşitul capitolului X, privind acizii ribonucleici virali, altul la sfîrşitul cărţii, referitor la termenii folosiţi în această carte.

Cartea mai este valoaroasă şi prin ultimul capitol care se referă la modele experimentale de izolare, purificare şi fracţionare a acizilor ribonucleici. —

Magdalena Dedu
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice,
Bucureşti

TADASHI KAWAI, *Clinical Aspects of the Plasma Proteins.* (Aspecte clinice ale proteinelor din plasmă), Igaku Shoin LTD. Tokyo, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg—New York. 1973, 464 pagini.

Cartea prezintă un deosebit interes prin faptul că autorul îşi propune ca, prin analiza teoretică a celor mai diferite aspecte ale proteinelor plasmatice umane, să contribuie la înţelegerea anomaliilor care survin în cadrul patologic la acest nivel, precum şi la diagnosticarea lor. Problematica tratată foloseşte largi aplicaţii în medicina clinică a celor mai diferite modele de proteine serice în care se utilizează tehnici electroforetice şi imunoelectroforetice moderne. Mai mult pe lîngă modificările produse în cazuri patologice, la nivelul proteinelor serice, autorul le aduce în prim plan şi pe cele ce au şoc la distanţă, ca urmare şi legăte de primele.

Cartea este împărţită în 4 secţiuni şi cuprinde în total 27 de capitole. Ca teme principale abordate se pot enumera: structura proteinelor, metode de analiză a proteinelor plasmatice, proprietăţile fizico-chimice şi biologice ale proteinelor plasmatice, metabolismul proteinelor plasmatice, precum şi anomaliile clinice ale acestora.

Valoarea cărţii se datorează şi bogatului material informativ (422 de indicaţii bibliografice), precum şi materialului iconografic adecvat.

Mioara Cârsteanu
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti

Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology (Tehnici moleculare şi abordarea unor probleme de biologie a dezvoltării), editor M. J. Chrispeels, Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto, 1973, 306 p.

Volumul de faţă cuprinde o parte din protocoalele şi experienţele realizate la ,,La Jolla Workshop in Molecular Techniques for Developmental Biologists''. Cartea cuprinde un cuvînt înainte (H. Stern), 11 referate şi un index de subiecte.

Referatele abordează probleme specifice ale dezvoltării organismelor vii, îmbinînd detaliile experimentale ale tehnicilor folosite, cu discutarea riguroasă, la un înalt nivel ştiinţific a rezultatelor obţinute.

Cartea descrie tehnici de izolare şi purificare a organitelor subcelulare ale ficatului de şobolan, metode de analiză a proteinelor specifice, din ţesuturile pe cale de diferenţiere ale şobolanului, un test pentru sinteza *de novo* a enzimelor în procesul de germinare a seminţelor, scheme de lucru intuitive şi deosebit de eficace în izolarea şi analiza DNA-ului celulelor eucariote,

posibilităţi de măsurare cantitativă a sintezei RNA-ului, metode de studiu a hibridării şi reasocierii acizilor nucleici extraşi din celulele animalelor superioare etc.

Calităţile grafice şi bibliografia de ultimă oră, aferentă fiecărui referat, întregesc valoarea metodică şi ştiinţifică a volumului de faţă.

Doina Popov
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice,
Bucureşti

MENDEL FRIEDMAN, *The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptides and Proteins* (Chimia şi biochimia grupării sulfhidril, în amino acizi, peptide şi proteine), Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig, 1973, 485 p.

Importanţa grupărilor sulfhidrilice — din punct de vedere structural, constituind precursori ai legăturilor disulfidice ce stabilizează structurile proteice şi, din punct de vedere funcţional, prin participarea directă în multe şi variate procese biologice — a constituit punctul de plecare al apariţiei volumului de faţă.

Autorul a realizat o îmbinare a aspectelor de chimie a aminoacizilor, peptidelor şi proteinelor ce posedă grupări sulfhidrilice, cu cele de biochimie a acestor compuşi. Organizarea materialului cuprins în volum reflectă tocmai această îmbinare: primele 11 capitole se ocupă de studiul reacţiilor chimice la care participă grupări sulfhidrilice: echilibre acid-bază, reacţii de oxidare, reacţii de eliminare, reacţii de deplasare; ultimele 5 capitole ale cărţii conţin căile metabolice şi biosintetice, reacţiile enzimatice şi implicaţiile farmacologice ale compuşilor sulfhidrilici analizaţi O altă caracteristică a volumului este coroborarea aspectelor prezentate de reacţiile respective *„in vitro"*, cu cele care au loc în organismul viu.

Tratarea problematicii, la un nivel fizico-chimic superior face ca volumul de faţă să fie deosebit de util specialiştilor în chimie, biochimie, enzimologie, farmacologie şi medicină. Aspectul grafic ireproşabil completează adecvat şi intuitiv conţinutul.

Cartea se încheie cu un index de subiecte şi unul de autori.

Doina Popov
Departamentul de Biochimie
Institutul de ştiinţe biologice,
Bucureşti

Protides of the biological fluids. (Proceedings of the 21 Colloquium, Brugge, 1973 (Protidele lichidelor biologice, lucrările celui de al 21-lea Colocviu, Brugge, 1973), Editor H. Peetrs, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig, 1974, 677 p.

Volumul de faţă cuprinde rezultatele cercetărilor recente asupra proteinelor membranelor şi proteinuriei. Un articol introductiv (autor: F. W. Putnam) prezintă o imagine de ansamblu asupra istoricului, stării actuale a cercetărilor şi posibilităţilor viitoare de investigare a proteinelor plasmatice.

Conţinutul cărţii este sistematizat în trei părţi: prima cuprinde lucrări referitoare la proteinele membranelor. Sînt prezentate date valoroase asupra solubilizării şi caracterizării acestor proteine (membrane eritrocitare, limfocitare, plasmatice etc.), asupra conformaţiei şi structurii lor, precum şi unele studii privind interacţiile lipide-proteine, care au loc în membranele biologice. Este relevată, de asemenea, funcţia imunologică a proteinelor membranelor şi ataşarea enzimelor de acestea.

Cea de a doua parte a volumului este afectată proteinelor urinare. Sînt incluse rezultate ale cercetărilor asupra proteinuriei de origine glomerulară şi tubulară (patologie, studii electroforetice, clearence-ul glomerular al proteinelor) şi sînt evidenţiate proprietăţi specifice ale unor proteine şi enzime urinare. Un capitol aparte este rezervat proteinelor secretoare şi caracterizării lor la nivel biochimic.

Ultima parte a cărţii cuprinde două metode imunologice, de ultimă oră, utilizate în analiza cantitativă a proteinelor: analiza nefelometrică automată şi radioimunoteste. În această parte sînt cuprinse şi detalii asupra tehnicilor de izotacoforeză analitică, electrofocusare etc.

Cartea se încheie cu un index de subiecte şi unul de autori.

Doina Popov
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Sectorul I.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

L. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

I. V. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 18, NR. 1, P. 1–64, BUCUREŞTI, 1975

I. P. „Informaţia" – c. 25

43816

Lei 20.–

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 18

1975

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 18, nr. 2, p. 65—142, 1975, Bucureşti

SCBIA5 — 18 (2), 65—142 (1975)

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România
S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România
M. MEZINCESCU
I. VASILESCU
TR. RĂDULESCU
VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

CECILIA MOTAŞ

Revista apera de 2 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 40 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii. Revista se poate procura (direct sau prin poştă) şi prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Toate comenzile externe pentru lucrările apărute în Editura Academiei Republicii Socialiste România se vor adresa la ILEXIM, SERVICIUL EXPORT-IMPORT CARTE ; SERVICIUL EXPORT-IMPORT PRESA (pentru reviste); PO BOX 2001, Calea Griviţei nr. 64—65, Bucureşti, oficiul poştal 12, România.

Manualele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie", Bucureşti, str. Docenţilor nr. 20, sectorul 1

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, Calea Victoriei 125, sectorul 1

ORVOSTUDOMÁNYI KÖZPONTI KÖNYVTÁR

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 18, nr. 2 1975

SUMAR

Z. ANCA, S. GABOR, Acţiunea ionilor de cadmiu şi asociaţia de ioni de cadmiu-zinc, asupra unor dehidrogenaze renale la şobolan 67

D. BEDELEANU, C. BÂCLEŞEANU, Cercetări asupra acţiunilor biochimice ale medicamentelor. I. Efectul unor antidiabetice orale şi ale insulinei asupra acizilor graşi şi treptelor lor de oxidare 73

G. BENGA, Fracţionarea subcelulară a ficatului uman. II. Caracterizarea mitocondriilor în condiţii patologice 83

S. A. CEAUŞESCU, Ionii de potasiu, sodiu şi calciu în sucurile obţinute din frunzele neiradiate şi iradiate cu raze ultraviolete 93

I. HAGIMA, Peroxidaza din coleoptilii de porumb 99

A. ICHIM, I. DINU, E. RADOVICI, E. CRISTEA, L. BOGHIANU, I. MIHĂILESCU, Efectul administrării de dimetoxi-triclor-hidroxi-etil fosfonat (Neguvon) şi N-metil-1-naftil carbamat (Carbaril) asupra unor reacţii enzimatice, la şobolanul alb. 103

G. ILLYES, G. NEAMŢU, C. BODEA, Cercetări chemotaxonomice la plante inferioare. I. Pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din *Cymbella cymbiformis* Kütz 109

V. JURCĂ, C. MATEI, Proteinele din muşchii scheletici la unele specii şi linii de ciprinide 115

M. LAKY, Interrelaţiile dintre structura imunoglobulinei A de tip secretor de iepure şi susceptibilitatea acesteia la proteoliză 119

G. MOŢA, Hidroliza triptică a IgA umane secretoare 123

D. PARASCHIVESCU, I. HURGHIŞIU, Conţinutul în glucide al mierii de mană şi florale de diferite provenienţe, ca urmare a relaţiilor trofice dintre Lachnidae-Formicidae-Apinae 129

S. RĂDULESCU, C.MOTAŞ, Comportarea la proteoliză a β-glucuronidazei în cursul procesului de extracţie din ţesut 135

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 18, nº 2 1975

CONTENTS

Z. ANCA, S. GABOR, Action of cadmium ions and cadmium-zinc ions association upon renal dehydrogenases in rat 67

D. BEDELEANU, C. BÂCLEŞEANU, Experimental investigations on the biochemical effects of drugs. I. Effect of some oral antidiabetic drugs and insulin upon fatty acids and their "in two stages" oxidation 73

G.BENGA, Subcellular fractionation of human liver. II. Characterization of mitochondria in pathological conditions 83

S. A. CEAUŞESCU, Potassium, sodium and calcium ions in juices obtained from unirradiated and irradiated leaves with UV rays 93

I. HAGIMA, Peroxidase of maize coleoptiles 99

A. ICHIM, I. DINU, E. RADOVICI, E. CRISTEA, L. BOGHIANU, I. MIHĂILESCU, Effect of dimethoxy-trichlorohydroxyethyl phosphonate (Neguvon) and N-methyl-1-naphthyl carbamate (Carbaryl) on some enzymatic reactions in rat tissues 103

G. ILLYES, G. NEAMŢU, C. BODEA, Chemotaxonomic investigations on lower plants. I. Carotenoid and chlorophyll pigments in *Cymbella cymbiformis* Kütz 109

V. JURCĂ, C. MATEI, The proteins in skeletal muscles in some species and lines of Cyprinidaes 115

M. LAKY, Interrelations between the rabit secretory immunoglobulin A structure and its susceptibility to proteolysis 119

G. MOŢA, Trypsin digestion of human secretory IgA. 123

D. PARASCHIVESCU, I. HURGHISIU, Glucide content of mildew and flower honey from various sources following nutrition relations in Lachnidae-Formicidae-Apinae 129

S. RĂDULESCU, C. MOTAŞ, Papain proteolysis of β-glucuronidase in different steps of extraction from tissue 135

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 67–72 (1975)

ACȚIUNEA IONILOR DE CADMIU ȘI ASOCIAȚIA DE IONI DE CADMIU-ZINC, ASUPRA UNOR DEHIDROGENAZE RENALE LA ȘOBOLAN

ZOE ANCA, SILVIA GABOR

Rezumat. — S-a studiat acțiunea cadmiului și a cadmiului în asociere cu zincul, asupra unor dehidrogenaze renale, în experiment „în vivo" și „in vitro", folosind preparatul de rinichi izolat și perfuzat de șobolan.
Ca acceptor de hidrogen am folosit trifeniltetrazoliu, iar ca substrate, piruvat, lactat, citrat și succinat.
Activitatea enzimatică a fost exprimată cantitativ în mg formazan.
Din rezultatele obținute în ambele modele experimentale rezultă că ionii de cadmiu administrați separat, produc perturbări semnificative la nivelul acelor sisteme enzimatice de oxido-reducere care necesită ca transportor de hidrogen — NAD.
În cazul asociației ionilor de cadmiu-zinc, efectul protector al zincului la nivelul dehidrogenazelor renale studiate, s-a evidențiat mai ales în cazul experimentului „in vitro".

Cadmiul este un poluant obișnuit al mediului înconjurător, prezența lui în apă, aer și alimente, constituind o sursă permanentă de contaminare a organismului uman (1, 2, 3, 4, 5, 6). Se depozitează în mod preferențial în ficat și rinichi sub formă de complex metalo-proteic (7, 8, 9).

În natură cadmiul se găsește în strînsă asociere cu alte metale, în primul rînd cu zincul. Referitor la acțiunea toxică a cadmiului, numeroase cercetări au evidențiat leziuni ale rinichilor, inclusiv apariția unei albuminurii cu caracter particular.

Sînt relativ puține date, privind efectul cadmiului asupra metabolismelor intermediare, inclusiv cel glucidic (10, 11, 12, 13).

Se cunoaște că unul din mecanismele prin care cadmiul își exercită acțiunea sa toxică, este acela de inhibare a enzimelor tiolactive (14, 15, 16).

Avîndu-se în vedere participarea efectivă a acestor enzime în procesele metabolice de oxidoreducere celulară, în prezenta lucrare ne-am propus investigarea acțiunii cadmiului asupra unor dehidrogenaze renale. Am ales rinichiul, întrucît acesta este organul „țintă" al acțiunii toxice a cadmiului.

Întrucît în literatură, se semnalează existența unei competiții între cadmiu și zinc (17, 18, 19, 20), am considerat că nu ar fi lipsit de interes investigarea, efectului acestor două metale administrate asociat, la nivelul dehidrogenazelor din rinichi.

MATERIAL ȘI METODĂ

Experiențele s-au efectuat pe șobolani albi, femele în greutate de 180—200 g. S-au folosit două variante experimentale:

1. — La un lot de 42 șobolani, ionii de cadmiu au fost administrați sub formă de $CdCl_2$ în concentrație de 10 mg/kg corp săptămînal,

prin injecţii subcutane. După sacrificarea animalelor la 14 şi 28 zile de la prima administrare, s-au prelevat rinichii, care au fost perfuzaţi cu soluţie Ringer-Krebs, îmbogăţit cu albumină serică umană 5%, la care s-au adăugat substratele (piruvat, lactat, citrat, succinat) şi 2,3,5-trifeniltetrazoliu (acceptorul de hidrogen).

Această variantă experimentală o denumim în lucrare „in vivo".

2. — La un alt lot de 37 şobolani — indemni, s-a prelevat rinichiul, care a fost perfuzat în condiţii identice celor descrise mai sus, cu deosebire că în lichidul de perfuzie s-a adăugat $CdCl_2$ în concentraţie de 4 mg/100 ml.

Această a doua variantă experimentală o denumim „in vitro" şi are avantajul faţă de prima variantă „în vivo" a unei cunoaşteri exacte a relaţiei doză-efect.

În cazul asociaţiei de ioni de cadmiu-zinc, aceste metale au fost administrate în proporţie de Cd : Zn = 1 : 1 după cum urmează :

În experimentul „in vivo" s-a administrat 10 mg/kg corp $CdCl_2 \cdot 2^1/_2\ H_2O$ şi 21,63 mg/kg corp $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (corespunzător la 4,92 mg/kg corp Cd^{++} şi 4,92 mg/kg corp Zn^{++}).

În experimentul „in vitro" s-a administrat 4 mg/100 ml $CdCl_2 \cdot 2^1/_2\ H_2O$ şi 8,62 mg/100 ml $Zn\ SO_4 \cdot 7H_2O$ (corespunzător la 1,96 mg/100 ml Cd^{++} şi 1,96 mg/100 ml Zn^{++}).

Pentru fiecare variantă experimentală, s-a folosit un lot de animale martor. În ambele experimente, s-a lucrat pe rinichi întreg, folosind preparatul de rinichi izolat şi perfuzat de şobolan, după tehnica descrisă într-o lucrare anterioară (12).

Durata perfuziei a fost de 60 minute la temperatura de 37°C ; presiunea de perfuzie 90 mm Hg ; debitul de perfuzie de 0,8—1 ml pe minut.

DETERMINAREA ACTIVITĂŢII DEHIDROGENAZICE

Principiul metodei aplicate, constă în reducerea enzimatică a 2,3,5-trifeniltetrazoliului în prezenţa diferitelor substrate şi formare de trifenilformazan derivat de culoare roşie, solubil în solvenţi organici (21). Această metodă a fost modificată de noi (12, 22) şi are avantajul de a furniza informaţii asupra activităţii dehidrogenazelor studiate sub raport cantitativ şi pe organul întreg, neprelucrat prin homogenizare.

Ca donatoare de hidrogen s-au folosit următoarele substrate în soluţii cu molarităţile : piruvat 11,36 mM/l şi citrat 0,52 mM/l, în experimentul „in vivo" şi piruvat 11,36 mM/l, citrat 0,52 mM/l, lactat 11,11 mM/l şi succinat 8,47 mM/l în experimentul „in vitro". Ca acceptor de hidrogen s-a utiliuzat 2,3,5-trifeniltetrazoliu în concentraţie de 25 mg/100 ml.

Pentru determinarea formazanului format după terminarea perfuziei, s-a secţionat o porţiune din polul apical al rinichiului în jur de 100—120 mg care a fost triturat şi extras de 5 ori în total cu 6 ml acetonă la 100 mg ţesut umed.

Extractele acetonice unite, au fost centrifugate şi spectrofotometrate la lungimea de undă de 493 nm.

Valorile obţinute, au fost exprimate în mg de tetrazoliu redus în 60 minute raportat la 100 mg ţesut renal umed.

Interpretarea rezultatelor s-a făcut pe baza următorilor indicatori statistici: media aritmetică ($\bar{X}$), dispersia şi probabilitatea (P).

În aprecierea rezultatelor, am luat în considerare numai preparatele de rinichi izolat, la care perfuzia a decurs în condiţiile cele mai corecte. Din această cauză numărul de animale nu este acelaşi la toate loturile.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele obţinute în experimentul „in vivo" sînt rezumate în tabela 1. Din tabelă rezultă că, în cazul utilizării piruvatului ca substrat, la loturile de animale intoxicate cu cadmiu, se observă o scădere semnificativă a

Tabela 1

Cantitatea de 2,3,5-trifeniltetrazoliu redus din rinichiul de şobolan sub acţiunea ionilor de cadmiu şi cadmiu-zinc

(mg/100 mg ţesut umed/60 minute) *„in vivo"*

Substratul	Martor	Cadmiu	Cadmiu-zinc	Timp de expunere (zile)
Piruvat	$\bar{x} = 3{,}0 + 0{,}5$ (6)	$\bar{x} = 2{,}2 + 0{,}7$ (6) $P = 0{,}01$	$\bar{x} = 3{,}07 + 0{,}68$ (4)	14
		$\bar{x} = 1{,}38 + 0{,}4$ (6) $P < 0{,}01$	$\bar{x} = 2{,}8 + 0{,}46$ (5) $P > 0{,}1$	28
Citrat	$\bar{x} = 3{,}8 + 1{,}1$ (7)	$\bar{x} = 2{,}2 + 0{,}9$ (6) $P < 0{,}02$	$\bar{x} = 3{,}52 + 0{,}67$ (5) $P > 0{,}5$	14
		$\bar{x} = 1{,}08 + 0{,}40$ (6) $P < 0{,}01$	$\bar{x} = 3{,}47 + 0{,}69$ (4) $P = 0{,}5$	28

Legenda: $\bar{x}$ = valori medii
( ) = număr de animale
P = probabilitatea

cantităţii de formazan atît la 14 cît şi la 28 zile de administrare a toxicului ($P = 0{,}01$; $P < 0{,}01$).

Această constatare ne permite să deducem că scăderea ritmului de reducere a trifeniltetrazoliului în cazul utilizării piruvatului ca substrat, este determinată de unele perturbări localizate la nivelul proceselor de aport de hidrogen şi de reducere a piruvatului la lactat.

În cazul utilizării citratului, ca donator de hidrogen am obţinut de asemenea o scădere semnificativă a cantităţii de formazan pentru amîndouă perioadele de intoxicaţie, efectul inhibitor a ionilor de cadmiu manifestîndu-se şi asupra sistemului enzimatic ce participă la dehidrogenarea citratului ($P < 0{,}02$; $P < 0{,}01$).

În cadrul asociației de ioni de cadmiu-zinc, activitatea de oxido-reducere, la nivelul enzimelor studiate, nu a suferit abateri semnificative față de lotul de animale martor. Din datele obținute reiese evident efectul protector al zincului față de acțiunea toxică a cadmiului manifestat asupra sistemelor de dehidrogenare studiate. Pe baza rezultatelor obținute în experimentul „in vivo" se constată că ambele sisteme enzimatice studiate care participă la dehidrogenarea tetrazoliului au fost afectate sub acțiunea toxică a ionilor de cadmiu. Rezultă de asemenea, că acțiunea de inhibare a cadmiului asupra dehidrogenazelor studiate este dependentă de perioadele de intoxicare. În cazul asociației de ioni de cadmiu-zinc valorile obținute, raportate la lotul martor sînt practic identice.

Datele obținute în experimentul „in vitro" sînt redate în tabela 2. Din tabelă se remarcă, că sub acțiunea singulară a ionilor de cadmiu,

Tabela 2

Cantitatea de 2,3,5-trifeniltetrazoliu redus din rinichiul de șobolan sub acțiunea ionilor de cadmiu și cadmiu-zinc
(mg/100 mg țesut umed/60 minute) *„in vitro"*

Substratul	Martor	Cadmiu	Cadmiu-zinc
Piruvat	$\bar{x} = 3 + 0{,}5$ (6)	$\bar{x} = 1{,}3 + 0{,}6$ (5) $P < 0{,}01$	$\bar{x} = 2{,}4 + 0{,}4$ (4) $P > 0{,}01$
Lactat	$\bar{x} = 5{,}1 + 1{,}4$ (5)	$\bar{x} = 1{,}6 + 0{,}2$ (6) $P < 0{,}01$	$\bar{x} = 2{,}73 + 0{,}44$ (4) $P < 0{,}01$
Citrat	$\bar{x} = 3{,}8 + 1{,}1$ (7)	$\bar{x} = 1{,}5 + 0{,}3$ (5) $P < 0{,}01$	$\bar{x} = 2{,}2 + 0{,}7$ (4) $P < 0{,}02$
Succinat	$\bar{x} = 4{,}5 + 1{,}2$ (4)	$\bar{x} = 3{,}3 + 1{,}1$ (4) $P > 0{,}1$	$\bar{x} = 3{,}04 + 0{,}25$ (5) $P > 0{,}01$

Legenda: $\bar{x}$ = valori medii
( ) = număr de animale
P = probabilitatea

folosind piruvatul și lactatul ca substrate a rezultat o scădere semnificativă a capacității de reducere de către celulele renale a trifeniltetrazoliului ($P < 0{,}01$; $P < 0{,}01$).

În cazul reacțiilor care au loc, și care final duc la formarea formazanului (donator de hidrogen → piruvat ⇌ lactat → tetrazoliu), leziunea biochimică este localizată deci în ambele faze (hidrogen → piruvat și lactat → tetrazoliu), interesînd cuplul piruvat ⇌ lactat (lactat: NAD — oxidoreductază).

În ceea ce privește activitatea enzimelor ce participă la dehidrogenarea citratului, (izocitrat-dehidrogenaza) este de asemenea semnificativ scăzută sub acțiunea ionilor de cadmiu ($P < 0{,}01$).

În schimb sistemul enzimatic, succindehidrogenază (succinat : FAD — oxidoreductază) nu este afectat ($P > 0,1$).

Combinaţia cadmiu-zinc în experimentul „in vitro", deşi ca valori medii cauzează o tendinţă de refacere a activităţii de reducere a trifeniltetrazoliului, faţă de lotul martor, (deci acelaşi sens ca în experimentul „in vivo"), efectul protector (antagonist) al ionilor de zinc în restaurarea activităţii de reducere, nu este statistic semnificativ.

Comparînd aceste sisteme enzimatice studiate în experimentul „in vitro", rezultă că ionul de cadmiu viciază acele sisteme de oxidoreducere care necesită ca transportor de hidrogen-NAD, în schimb nu afectează sistemul succinat-oxidoreductază care nu este strict NAD-dependent, ci poate transfera hidrogenul direct pe FAD, fără a fi nevoie de NAD ca intermediar.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obţinute în ambele modele experimentale se poate deduce că :

— ionul de cadmiu intervine ca element inhibitor în trecerea hidrogenului de pe substrat pe NAD ;

— s-a putut demonstra în intoxicaţia experimentală cu cadmiu, efectul protector al zincului faţă de ionii de cadmiu, la nivelul dehidrogenazelor renale studiate.

Prezentat la redacţie
la 28. II. 1974

Institutul de igienă şi sănătate publică,
Cluj-Napoca

ACTION OF CADMIUM IONS AND CADMIUM-ZINC IONS ASSOCIATION UPON RENAL DEHYDROGENASES IN RAT

SUMMARY

The action of Cd ions either isolated or in association with Zn has been studied on renal dehydrogenases through *in vivo* and *in vitro* experiments by using preparations of isolated and perfused rat kidney tissue. Triphenyltetrazolium was employed as hydrogen acceptor, while pyruvate, lactate, citrate and succinate served as substrates. The enzymatic activity was expressed quantitatively in mg formazan.

The results obtained showed that in both kinds of experiments significant troubles occurred after separate administration of Cd ions at the level of these oxydo-reductory enzymatic systems requiring NAD as hydrogen transportor. They also showed that when Cd was administrated, in association with Zn, the protective effect of Zn at the level of renal dehydrogenases was noted mainly in *in vivo* experiments.

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Long — Term Programme in Environment Pollution Control in Europe. Technical documents on Arsenic, Cadmium, Lead, Manganese and Mercury*, Whorld Health Organization. Copenhagen, 23 (1973).
2. B. A. Axelsson, M. Piscator, Arch. Environm. Health, **12**, 360 (1966).
3. J. A. Bonnelli, J. A. Ross, E. King, Brit. J. Med., **17**, 69 (1970).
4. P. Michaux, H. L., Boiteau, F. Tolot, Arch. Mal. Prof., **32**, 124 (1971).
5. M. Pujol, J. Arlet, R. Bollinelli, P. Charles, Arch. Mal. Prof., **31**, 637 (1970).
6. E. C. Vigliani, B. Pernis, A. Luisa, Med. Lavoro, **57**, 321 (1966).
7. B. G. Malnesträm, Rev. Ref. și Recenzii de Biologie, **2**, 261 (1965).
8. A. Zahir, D. Shaikh, J. L. Ojars, Arch. Environm. Health, **24**, 419 (1972).
9. Z. Nowacki, Bull. of Hyg., **37**, 139 (1962).
10. A. Sporn, I. Dinu, L. Stoenescu, A. Cîrstea, L. Ghizelea, Igiena, **19**, 201 (1970).
11. A. Sporn, A. Cîrstea, L. Ghizelea, I. Dinu, L. Boghianu, L. Ozeranschi, E. Bolescu, Igiena, **19**, 729 (1970).
12. Z. Anca, St, cerc. biochim., **16**, 5 (1973).
13. T. Ghafghazi, J. A. Mennear, Toxicol. and. Appl. Pharmacol., **26**, 231 (1973).
14. G. Pettering, A. Harold, Arch. Environm. Health, **23**, 320 (1971).
15. O. I. Lucis, R. Lucis, Z. A. Shaikn, Arch. Environm. Healt., **25**, 1 (1972).
16. H. Boissou, M. Fabre, Arch. Mal. Prof. **26**, 127 (1965).
17. A. M. Cirla, Med. Lavoro, **60**, 321 (1969).
18. L. Dérobert, *Intoxication et maladies professionnelles*, Edit. Flamarion, Paris, 506 (1954).
19. L. S. Goodman,A. Gilman, *Bazele Farmaceutice ale terapiei medicale*, Edit. medicală București, 832 (1960).
20. A. Granata, M. Barbara, L. Maturio, Arch. Mal. Prof., **31**, 357 (1970).
21. P. Georgescu, E. Păunescu, *Metode biochimice de diagnostic și cercetare*. Edit. medicală, București 394 (1960).
22. T. Frits, S. Gabor, Z. Anca, St. cerc. biochim., **15**, 157 (1972).

ST. ŞI CERC. BIOCHIM., 18, 2, 73–81 (1975)

CERCETĂRI ASUPRA ACŢIUNILOR BIOCHIMICE ALE MEDICAMENTELOR

I. EFECTUL UNOR ANTIDIABETICE ORALE ŞI ALE INSULINEI ASUPRA ACIZILOR GRAŞI ŞI TREPTELOR LOR DE OXIDARE

DAN BEDELEANU, CORNELIA BÂCLEŞEANU

Rezumat. — Dozarea acizilor graşi liberi (AGL) cu două metode diferite (titrimetrică şi spectrofotometrică) arată un nivel crescut la şobolanii cu diabet aloxanic experimental în ficat şi plasmă şi scăzut în ţesutul adipos epidimal.
Oxidarea acizilor graşi, în două trepte (cu octanoat şi octanoat+fumarat) arată o scădere în cazul „fracţiunii mitocondriale" obţinută din ficatul animalelor cu diabet faţă de cele normale.
Medicamentele antidiabetice studiate: *tolbutamida, cicloral* şi *insulina* au tendinţa de normalizare a parametrilor afectaţi, dar cu variaţii cantitative ce relevă corelaţia *structură chimică-activitate biologică.*
Datele prezentate oferă premisele unor indicaţii terapeutice individualizate şi nuanţate bazate pe criterii obiective biochimice care să urmărească nu numai efectul major (hipoglicemiant) ci şi efectele colaterale (asupra metabolismului lipidic), în dependenţă de parametrii biochimici care definesc „individualitatea biochimică" a pacientului în momentul şi pe parcursul administrării medicamentului.

Progresul biochimiei clinice a relevat interrelaţiile strînse dintre diferitele metabolisme şi a condus la reconsiderarea semnificaţiei unor indicatori biochimici. În ateromatoză, privită ca o tulburare a metabolismului lipidic prin excelenţă, am constatat leziuni enzimatice ale metabo-

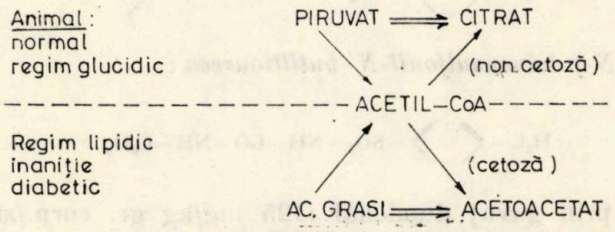


Fig. 1. Căile metabolismului acetil-CoA („C_2") în mitocondriile hepatice (după P. B. Garland (14, p. 41)).

lismului glucidic, insulinei şi mecanismelor de control umoral, tisular şi al particulelor subcelulare, pe baza cărora am enunţat ipoteza stării de *prediabet* în ateromatoză (1)–(8). Recent, printr-un model bicompartimental computerizat se consemnează deosebiri în cinetica glucozei şi insulinei la diabetici şi obezi faţă de normali, cu alterarea mecanismelor de control (9). Pe de altă parte se acordă atenţie afectării metabolismului lipidic semnalîndu-se că la animalele diabetice (10) sau cu regim bogat în lipide (11) substratul preferenţial oxidat este reprezentat de acizii graşi, iar la cele cu regim normal sau bogat în glucide, piruvatul (fig. 1).

Considerînd rolul energetic şi particularităţile de metabolizare ale acizilor graşi (14)—(17) şi nivelul de acţiune al substanţelor hipoglicemiante (18)—(29), în lucrarea de faţă ne-am propus să urmărim efectul unor antidiabetice orale : *Tolbutamida* şi *Cicloral* şi ale *insulinei* asupra repartizării (cineticii) acizilor graşi liberi (AGL) în ficat, ţesutul adipos epidimal şi plasmă (ser) şi asupra treptelor de oxidare ale acizilor graşi din mitocondriile hepatice, comparativ între animalele normale şi diabetice.

Asemenea cercetări pot fi utile în *instituirea unei terapii antidiabetice fundamentată pe criterii obiective biochimice*, individualizată şi nuanţată atît după starea clinică a bolnavului (individualitate biochimică) cît şi după particularităţile de acţiune ale medicamentelor (structură chimică) în scopul obţinerii unor efecte optime şi a evitării unor acţiuni secundare şi adverse, în ideea *măsurilor de farmacovigilenţă* impuse şi în ţara noastră (30).

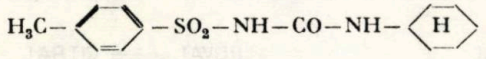
MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe şobolani albi masculi tineri (120—150 g) în condiţii standard de laborator, grupaţi în două loturi principale : *normali* (*N*) şi cu *diabet aloxanic* (*D*) subdivizate după terapia instituită : *insulină* (*N* + *I* şi *D* + *I*), *cicloral* (N + C şi D + C) şi tolbutamidă (*N* + *T* şi *D* + *T*).

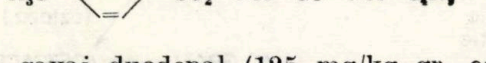
A. *Diabetul experimental* s-a produs cu ajutorul *aloxanului* (BDH-Reagent) în soluţie tampon fosfat-citrat pH 7,2, administrat intraperitoneal în doze 10 şi 15 mg/ml/100 g greut. corp. (31, 21—25).

B. Dintre *medicamentele antidiabetice orale* s-au utilizat :

Cicloral : *N-p-toluensulfonil-N'-ciclohexilureea* :



Tolbutamid : *N-p-toluensulfonil-N'-butiltioureea* :



administrate prin gavaj duodenal (125 mg/kg gr. corp./zi) precum şi *Insulina*, în injecţii subcutane (4 U.I./kg gr. corp.).

C. *Ca materiale biologice de analizat au servit* :

a. *Sîngele* recoltat din sinusul cavernos (ochiul) sau decapitare

b. *Ficatul* şi *ţesutul adipos epidimal* prelevate imediat după sacrificare în soluţie KCl izotonică şi omogenizate (10% în KCl).

c. *Mitocondriile hepatice*, după Hogeboom (32) prin omogenizarea 1 p. ficat cu 9 p. zaharoză 0,25 M pH 7,4 (la 0—4°C), centrifugare 1 000 × × g/5 min, urmată de centrifugări repetate ale supernatantului la 9.200 × × g/10 min. Peletele mitocondriale se transferă în zaharoză 0,25 M; supernatantul se centrifughează la 16 000 r.p.m./10 min. Sedimentul se aduce final la 5 ml, cu zaharoză 0,25 M.

D. *Determinările biochimice*:
a. *Glicemia*, după Nelson-Somogyi (33)
b. *Proteinele*, după Gornall și col. (34)
c. *Acizii grași liberi*, după două metode diferite:
1. *metoda titrimetrică Dole* (35): extragerea lipidelor într-o singură fază (heptan-alcool izopropilic-acid sulfuric), convertirea într-un sistem bifazic (heptan-apă) și titrarea cu NaOH 0,018 N (în azot), și 2. *metoda spectrofotometrică Novak* (36): extracția cu amestec Dole, apoi cu cloroform-heptan și determinarea culorii formate cu „reactivul cobaltic" în prezență de α-nitrozo-β-naftol(alcoolic) la 510 nm (Spekol).

d. *Determinarea treptelor de oxidare ale acizilor grași* s-a efectuat pe fracțiunea mitocondrială (punct C.c) prin metoda Warburg, după Lehninger (37). Pentru aprecierea primei trepte de oxidare s-a utilizat ca substrat acidul caprilic (octanoat) în concentrație finală de 0,001 M, iar pentru treapta a II-a s-a adăugat și acid fumaric în concentrație finală de 0,0005 M. Schema de lucru este dată în *tabela 1*.

Tabela 1

Schema de lucru pentru determinarea treptelor de oxidare ale acizilor grai în prezența „fracțiunii mitocondriale" hepatice

Substanța adăugată	Conc. soluției	Cantitatea adăugată (ml)	Conc. finală (M)
a. *În compartimentul principal al vasului Warburg*:			
Tampon fosfat pH 7,4	0,1 M	0,4	0,02
ATP	0,015 M	0,2	0,0015
$MgCl_2$	0,1 M	0,15	0,0075
Citocrom C	3×10^{-4} M	0,15	0,000015
KCl	1 M	0,1	0,05
b. *În brațul lateral*:			
Octanoat la pH 7,4	0,01 M	0,2	0,001
Apă bidistilată	—	0,3	—
Suspensie mitocondrială	—	0,5	—
c. *În cuva centrală*:			
KOH 20% (pe rolă de hîrtie de filtru :		0,2	

OBSERVAȚIE: pentru determinarea treptei a II-a de oxidare se lucrează la fel, dar se adaugă 0,1 ml soluție fumarat 0,01 M la concentrația finală de 0,0005 M, scăzînd volumul apei cu 0,1 ml.

După termoechilibrarea la 25°C/15 min., se răstoarnă conținutul brațului lateral în vasul principal și se fac citirile din 5 în 5 min., rezultatele exprimîndu-se în μ atomi *O*/mg proteină, la timpul 20 min.

REZULTATE

Variațiile acizilor grași liberi (*AGL*) din plasmă (*P*), ficat (*F*) și țesutul adipos epidimal (*TAE*) la animalele normale (*N*) și tratate cu tolbutamidă (*T*) sau insulină (*I*) și la animalele diabetice (*D*) față de cele

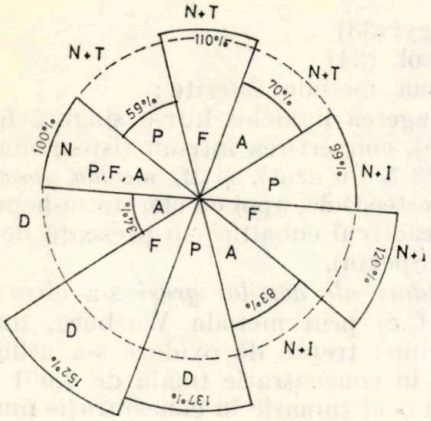


Fig. 2. Variaţiile acizilor graşi liberi (AGL) la animalele normale (N) şi tratate cu tolbutamidă (T) sau insulină (I) şi la animalele diabetice (D) in plasmă (P), ficat (F) şi ţesutul adipos epididimal (A).
Cercul punctat reprezintă valoarea de referinţă a animalelor normale (100 %).

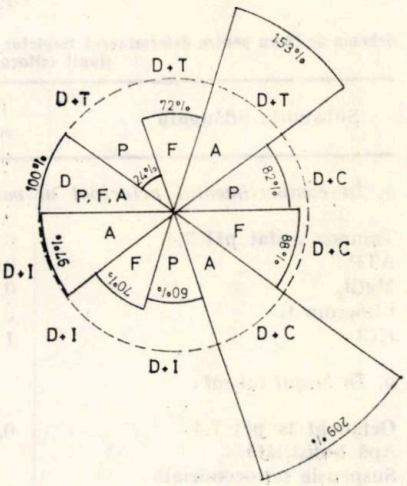


Fig. 3. Variaţiile acizilor graşi liberi din plasmă (P), ficat (F) şi ţesutul adipos epididimal (A) la animalele diabetice (D) tratate cu tolbutamidă (T), cicloral (C) şi insulină (I).
Cercul punctat reprezintă valoarea de referinţă a animalelor diabetice netratate (100 %).

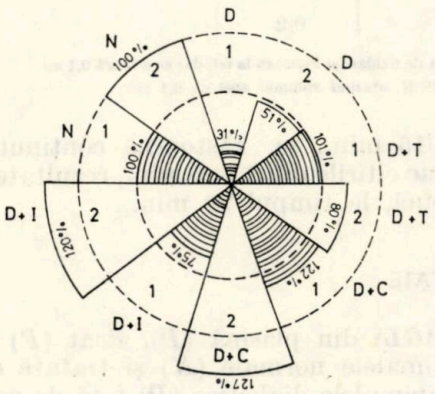


Fig. 4. Variaţiile treptelor de oxidare ale acizilor graşi cu „fracţiunea mitocondrială" hepatică la animalele diabetice (D) şi tratate cu tolbutamidă (T), cicloral (C) şi insulină (I)
Cercul punctat şi coloanele haşurate (1.) reprezintă I-a treaptă de oxidare la animalele de referinţă normale ($N = 100\ \%$); cercul punctat exterior şi coloanele nehaşurate (2.) reprezintă a II-a treaptă de oxidare, la animalele normale ($N = 100\ \%$).

normale sînt prezentate în *figura 2*. Modificările produse de *I*, *T* și cicloral (*C*) la animalele *D*, luate ca referință, *în figura 3*.

Rezultatele cu privire la I-a și a II-a treaptă de oxidare a acizilor grași pe preparatele mitocondriale hepatice, exprimate procentual pe baza μAO consumați/mg proteină sînt prezentate pentru animalele *N* și *D* tratate cu *T*, *C* sau *I* *în figura 4*.

DISCUTAREA REZULTATELOR

A. Acizii grași liberi (AGL)

Rezultatele noastre (figura 2) confirmă caracterizarea condiției de diabet prin nivelul crescut al *AGL* din ficat și plasmă și scăzut în țesutul adipos, cu afectarea mecanismelor de utilizare a glucidelor și de convertire a acestora în lipide (19, 43).

AGL din ficatul animalelor normale este puțin influențat de tolbutamidă și insulină (creșterile sînt nesemnificative statistic).

La animalele diabetice, care prezintă o valoare semnificativ crescută a *AGL* din ficat (152%) (figura 2), medicamentele antidiabetice au un efect antilipolitic manifestat prin scăderea (normalizarea) nivelului lor, în ordinea: $I > T > C$ (figura 3).

Țesutul adipos epidimal, considerat ca „model" al comportării în general al țesuturilor adipoase, prezintă la animalele *D* un conținut foarte scăzut al *AGL* (34% față de *N*) (figura 2). Medicamentele antidiabetice (*T* și *I*) produc o scădere a *AGL* la animalele *N*, în timp ce la animalele cu diabet, *T* și *C* au un efect invers, de creștere al *AGL* și prin urmare de „normalizare" a acestui indicator. Insulina, în condițiile noastre experimentale, nu produce efecte semnificative (figura 3).

Creșterea *AGL* din țesutul adipos sugerează un impuls insulinic, ca rezultat al eliberării sale prin antidiabeticele orale (19). Acțiunea *T* și *C* s-ar putea explica prin efectul lor asupra celor două procese fundamentale implicate în controlul nivelului lipidelor: scăderea lipolizei și intensificarea reesterificării *AGL* cu glicerol-(*P*), prin stimularea glicolizei (deficitare în diabet) la un nivel capabil să asigure glicerol-(*P*) necesar biosintezei trigliceridelor.

La animalele normale insulina nu modifică *AGL* din plasmă, în timp ce *T* determină o scădere (figura 2). Nivelul *AGL* plasmatici apare crescut la animalele *D* (137%) față de *N* (figura 2) și medicamentele cercetate au un efect de scădere a valorii lor în ordinea: $T > I > C$ (figura 3), expresie a tendinței de „normalizare" prin scăderea *AGL*, forma cea mai mobilă și mai eficient metabolizabilă a lipidelor.

Considerînd comportarea *în ansamblu a AGL* la nivelul celor trei compartimente cu importanță majoră în metabolismul lipidic: ficat, țesut adipos și plasmă, se poate constata că la animalele *N*, *I* și *T* nu au influență asupra conținutului din *F* și *TAE*, sau au chiar efecte inverse față de animalele *D*; *I* este lipsită de efecte asupra *AGL* plasmatici, în timp ce *T* determină scăderea lor, atît la animalele *N* cît și *D* (figura 2). La animalele cu diabet, atît *I* cît și *C* și *T* au efecte de „normalizare" a nivelului *AGL*, prin scăderea lor din compartimentele în care se găsesc crescute

în diabet (ficat și plasmă) și creșterea (prin *T* și *C*) în țesutul adipos, unde sînt scăzuți în *D*.

Efectele medicamentelor antidiabetice orale și ale insulinei se pot deci explica prin *reechilibrarea repartizării* (cineticii) *AGL* din cele trei compartimente, *dar cu un profil și grad de intensitate diferit*, după natura (structura chimică) a medicamentului (fig. 2 și 3).

B. Treptele de oxidare ale acizilor grași

În mitocondriile țesuturilor capabile să oxideze acizii grași (*AG*), degradarea acestora are loc în două trepte (37) și anume:

Treapta I-a: $C_7H_{15}COOH + 3O_2 \rightarrow 2CH_3-CO-CH_2-COOH + 2\,H_2O$

Treapta II-a: $C_7H_{15}COOH + 11\,O_2 \rightarrow 8\,CO_2 + 8\,H_2O$

Ficatul este practic singurul organ capabil să convertească intens $CH_3 \sim SCoA$ la oxaloacetat, în paralel cu scăderea concentrației *ATP*-ului, de aceea în mitocondriile ficatului se produce în continuu $CH_3CO \sim SCoA$ din piruvat, dar viteza de oxidare a fragmentului „C_2" este limitată de conținutul redus de *ADP* (11).

Sinteza acetoacetatului (41) în sistemele cu fosforilare oxidativă cuplată este controlată de oxidarea palmitoil-carnitinei; în prezență de agenți decuplanți aceste efecte sînt abolite la nivelul etapelor *a-e* din schema lui Garland (14) ilustrată în *figura 5*, iar reacția malatdehidrogenazei (*MDH*) se desfășoară în direcția formării de oxalacetat.

Unele din leziunile majore biochimice in diabet (și inaniție) sînt suprimarea biosintezei *AG* de la acetoacetat (38) datorită afectării unor enzime (22, 39, 40) și a mobilizării *AG* din țesutul adipos, ca urmare a tulburării metabolismului glucozei, cu creșterea *AG* din plasmă și ficat ce determină triada: „steatoză hepatică, hiperlipemie și formarea corpilor cetonici" (43).

Insulina ar acționa la nivelul clivării citratului (14, 42) și ar favoriza ciclul citric și șuntul pentozofosfatic în celula hepatică și prin aceasta formarea *ATP* și *NADPH* necesari biosintezei acizilor grași. Rezultatele noastre relevă scăderea ambelor trepte de oxidare ale *AG* la animalele diabetice (figura 4), constatare ce se corelează cu nivelul crescut al acizilor grași din ficat (figura 2).

Efectul sulfamidelor hipoglicemiante se atribuie stimulării sintezei de insulină (43). Cercetările noastre anterioare sugerează un mecanism de acțiune prin intermediul sistemelor enzimatice (22, 23) iar urmărirea fluxului glucozei și lactatului pe modelul inimii perfuzate *in vitro* relevă efecte nuanțate pentru tolbutamidă și Daonil (44).

Rezultatele expuse indică efectele de *normalizare* ale cineticii *AGL* în trei compartimente cu rol major în metabolismul lipidic, cu dirijarea lor din plasmă (unde sînt crescuți în diabet) spre țesutul adipos (unde sînt scăzuți) și cu intensificarea oxidării *AG* în ficat (unde sînt crescuți în diabet).

Acest ansamblu de efecte, cu diferențe cantitative și chiar calitative între medicamentele antidiabetice cercetate, reflectă o expresie a relației *„structură chimică-activitate biologică"* și oferă premisele unor indicații terapeutice nuanțate, pe baza nu numai a influențării indicatorilor majori

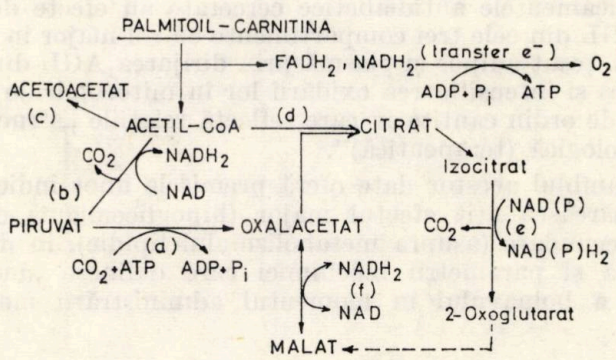


Fig. 5. Punctele de control metabolic al mitocondriilor hepatice care oxidează palmitoil-carnitina (după P. B. Garland (14, p. 57)).

Nivelul de acțiune al palmitoil-carnitinei în mitocondriile cu fosforilare oxidativă cuplată:

(a). piruvat carboxilaza (stimulată)
(b). piruvat oxidarea (inhibată)
(c). sinteza acetoacetatului (stimulată)
(d). sinteza citratului (inhibată)
(e). oxidarea izocitratului (inhibată)
(f). reacția malat-dehidrogenazei, reversibilă (în cazul carboxilării piruvatului la oxalacetat are loc transformarea oxalacetatului în malat).

(hiperglicemie, glicozurie, cetonurie) ci și pe baza efectelor biochimice colaterale (de ex. asupra metabolismului lipidic). Selectarea medicamentului s-ar putea face astfel în dependență de mai mulți parametri biochimici care reflectă mai fidel „individualitatea biochimică" ce caracterizează condiția patologică a pacientului în momentul instituirii terapiei și pe tot parcursul acesteia (45).

CONCLUZII

1. Modelul șobolanilor cu diabet aloxanic experimental arată un nivel crescut față de normali al AGL (acizi grași liberi) din ficat și plasmă și scăzut în țesutul adipos epidimal. Medicamentele antidiabetice au o tendință de „normalizare" a acestor parametri prin scăderea AGL hepatici în ordinea: insulină > tolbutamidă > cicloral și din plasmă în ordinea: tolbutamidă > insulină > cicloral și prin creșterea AGL din țesutul adipos (tolbutamidă, cicloral). Efectele pe animalele normale sînt mai puțin semnificative și chiar inverse celor de la animalele diabetice.

2. „Fracțiunea mitocondrială" din ficatul animalelor cu diabet prezintă o capacitate de „oxidare a acizilor grași" scăzută față de animalele

normale atît la nivelul treptei I de oxidare a octanoatului pînă la aceto-acetat cît şi a treptei a II-a de oxidare pînă la $CO_2 + H_2O$ (octanoat + + fumarat), aprecierea făcîndu-se prin determinarea consumului de oxigen în aparatul Warburg. Insulina, tolbutamida şi cicloralul cresc valoarea ambelor trepte de oxidare, dar mai puternic a oxidării complete.

3. Medicamentele antidiabetice cercetate au efecte de normalizare a cineticii AGL din cele trei compartimente cu rol major în metabolismul lipidic : ficat, ţesut adipos şi plasmă prin dirijarea AGL din plasmă spre ţesutul adipos şi intensificarea oxidării lor în mitocondriile hepatice, dar cu diferenţe de ordin cantitativ care reflectă relaţiile „structură chimică-activitate biologică (terapeutică)".

4. Ansamblul acestor date oferă premisele unor indicaţii nuanţate care să urmărească atît efectul major (hipoglicemiant) cît şi efectele biochimice secundare (asupra metabolismului lipidic), în dependenţă de starea clinică şi parametrii biochimici care definesc „individualitatea biochimică" a bolnavului în momentul administrării medicamentului.

Prezentat la redacţie
la 15 februarie 1974

Disciplina de Biochimie farmaceutică
şi clinică
Institutul de Medicină
şi Farmacie
Cluj-Napoca

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS ON THE BIOCHEMICAL EFFECTS OF DRUGS

1. EFFECT OF SOME ORAL ANTIDIABETIC DRUGS AND INSULIN UPON FATTY ACIDS AND THEIR "IN TWO STAGES" OXIDATION

SUMMARY

Free fatty acids (FFA, NEFA) measured by two different techniques (titrimetric and spectrophotometric) reached high values in the liver and plasma and decreased in the epididimal fat tissue of alloxan diabetic rats, when compared to the control animals.

Investigation of fatty acids oxidation "in two stages" (with octanoate and octanoate + fumarate) emphasized a decrease with the liver "mitochondrial fraction" obtained from the diabetic rats.

A tendency towards normalization of the above deteriorated biochemical parameters was noted after an antidiabetic medication with *Tolbutamid*, *Cycloral* or *Insulin*. It was also possible to establish quantitative variations between these drugs effects, suggestive for a "structure-activity" relationship.

It is considered that such investigations on biochemical side effects revealed complementary objective criteria for the correct therapeutical indications of antidiabetic drugs in accordance with the patient's "biochemical individuality" before and during the medication.

BIBLIOGRAFIE

1. I. MANTA, D. BEDELEANU, L. MUREȘAN, V. GORUN, St. cerc. biochim. **4**, 31 (1961).
2. I. MANTA, D. BEDELEANU, T. LAZĂR, V. GORUN, D. IONESCU, Fiziol. norm. patol., **8**, 321 (1962).
3. I. MANTA, D. BEDELEANU, L. MUREȘAN, O. BÂRZU, P. PITEA, I. MISSITS, Fiziol. norm.patol., **10**, 69 (1964).
4. I. MANTA, D. BEDELEANU, O. BÂRZU, Rev. roum. Biochim., **1**, 11 (1964).
5. I. MANTA, D. BEDELEANU, Bioch. Pharmacol. Conf. Iss., **12**, 15 (1963).
6. I. MANTA, D. BEDELEANU, Rev. roum. Biol., **11**, 301 (1966).
7. D. BEDELEANU, O. BÂRZU, Regional Congr. Int. Un. Physiol., Abstracts, 262, Brașov (1970).
8. D. BEDELEANU, *Leziuni biochimice intracelulare în ateromatoza experimentală*, Teză de doctorat, 507 pag., IMF Cluj (1966).
9. G. SEGRE, G. L. TURCO, G. VERCELLONA, Diabetes, **22**, 94 (1973).
10. D. G. NICHOLLS, D. SCHEPHERD, Biochem. J., **103**, 677 (1967).
11. P. B. GARLAND, P. J. RANDLE, Biochem. J. **91**, 6 e (1961).
12. D. SHEPHERD, P. B. GARLAND, Biochem. Biophys. Res. Comm., **22**, 89 (1966).
13. P. K. TUBBS, P. B. GARLAND, Biochem. J., **89**, 258 (1963).
14. P. B. GARLAND, in The metabolic roles of Citrate, ed. T. W. Goodwin, Academic Press, New York, London, 144 pag. (1968).
15. I. MANTA, D. BEDELEANU, C. BÂCLEȘEANU, O. BÂRZU, G. JEBELEANU, *Biochimie medicală*, ed. Didactică și pedagogică, 754 pag., București (1968).
16. G. V. VAHOUNY, J. LILJENQUIST, R. WILSON, A. LIAO, L. RODIS, Arch. Biochem. Biophys., **125**, 809 (1968).
17. B. SWINGEDAUW, P. J. HYATT, Pr. Mèd. **78**, 211 și 459 (1970).
18. E. F. PFEIFFER, Therapiewoche, **21**, 553 (1971).
19. GH. S. BĂCANU, *Medicamente antidiabetice*, Ed. Centrala industrială de medicamente și coloranți, 187 pag., București (1972).
20. S. RAPTIS, E. F. PFEIFFER, Therapiewoche, **21**, 578 (1971).
21. W. LEONHARDT, T. HANEFELD, H. HALLER, Medicamentum (Berlin, RDG), **27**, 14 (1973).
22. C. BÂCLEȘEANU, *Cercetări enzimatice asupra acțiunii medicamentelor antidiabetice*, Teză de doctorat, 329 pag., IMF Cluj (1969).
23. C. BÂCLEȘEANU, V. GORUN, Clujul Medical, **44**, 395 și 669 (1971).
24. Z. COJOCARU, C. BÂCLEȘEANU, Revista Medicală (Tg. Mureș) **17**, 415 (1971).
25. C. BÂCLEȘEANU, Z. COJOCARU, C. NISTOR, St. cerc. biochim., **16**, 243 (1973).
26. K. GUTSCHE, E. SCHRÖDER, C. RUFER, O. LOGE, Arzneim. Forsch. **24**, 1028 (1974).
27. C. RUFER, H. BIERE, H. AHRENS, O. LOGE, E. SCHRÖDER, Journ. Med. Chem., **17**, 708 și 916 (1974).
28. W. LOSERT. E. SCHILLINGER, W. KRAAZ, O. LOGE, P. JAHN, Arzneim. Forsch. **22**, 1157, 1413, 1540 și 1752 (1972).
29. W. PULS, W. LOSERT, O. LOGE, E. SCHILLINGER, U. KEUP, E. KRONENBERG, Arzneim. Forsch. **24**, 375 (1974).
30. *** Farmacovigilența, vol. I-III, Ed. Medicală, București (1973).
31. A. MADAR, E. PORA, Studia Univ. Babeș-Bolayi (Cluj), seria biologie, **10**, 127 (1965).
32. G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER, G. F. PALLADE, J. Biol. Chem., **172**, 619 (1948).
33. W. SOMOGYI, N. NELSON, J. Biol Chem., **153**, 375 (1944).
34. A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL, M. M. DAVID, J. Biol. Chem., **177**, 751 (1949).
35. W. DOLE, J. Clin. Invest., **35**, 150 (1956).
36. M. NOVAK, J. Lip. Res., **6**, 431 (1965).
37. A. L. LEHNINGER, *Methods in Enzymology*, ed. S. P. Colovick, N. O. Kaplan, Academic Press, vol. I, p. 545, New York (1955).
38. A. GAJDOS, Pr. Méd., **73**, 1503 (1965).
39. N. BENJAMIN, W. GELLHORN, J. Biol. Chem. **239**, 64 (1964).
40. W. B. GREENOUGH, Lancet, II (7530), 1334 (1967).
41. J. ENGLAND, Biochem. J., **105**, 903 (1967).
42. A. F. SPENCER, J. N. LOWENSTEIN, Biochem. J., **103**, 342 (1967).
43. A. LOUBATIÈRES, Le Diabète, **IV**, 217 (1956); **VI**, 31 (1958); Pr. méd. **63**, 1701 (1955); **68**, 1421 și 1441 (1960).
44. D. BEDELEANU, C. BÂCLEȘEANU, C. ȚĂRMURE, *Al VI-lea Congres Național de Farmacie*, Rapoarte-Comunicări (rezumate) p. 314, București (1973).
45. D. BEDELEANU, *A XI-a Ses. șt. a cadrelor didactice IMF* (Rezumatele lucrărilor) p. 87, Cluj (1973).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 83–91 (1975)

FRACȚIONAREA SUBCELULARĂ A FICATULUI UMAN.
II. CARACTERIZAREA MITOCONDRIILOR ÎN CONDIȚII PATOLOGICE

GHEORGHE BENGA

Rezumat. — În bolile hepatice, consumul de oxigen cu substratele NAD-dependente și indicele controlului acceptor sînt scăzute, mai ales în cazul icterelor prelungite.
Determinarea activității ATP-azice, ca test de suferință mitocondrială, trebuie făcută la pH 8,5, măsurînd activitatea bazală, Mg-ATP-aza și DNP-ATP-aza, în absența albuminei (cu 0,05 mM DNP) și în prezența albuminei (cu 0,25–0,4 mM DNP la pH 8,5). Mitocondriile izolate din ficatul uman normal prezintă o activitate bazală joasă, o stimulare mică prin Mg^{2+} și o stimulare mare prin DNP. În cazul suferinței „reversibile" a mitocondriilor, activitatea stimulată de Mg^{2+} poate fi mai mare decît activitatea stimulată de DNP în absența albuminei, pe cînd în prezența albuminei se obține o reversare a raportului DNP-ATP-ază /Mg-ATP-ază. În condiții patologice s-a observat o suferință „ireversibilă" a mitocondriilor. Aceasta este caracterizată prin valori mari ale activității bazale și ale Mg-ATP-azei, pe cînd stimularea prin DNP este mică, indiferent dacă la mediul de incubare se adaugă sau nu albumină.

Deși se consideră că la om ficatul este organul cel mai bine studiat din punct de vedere enzimologic, cercetările pe omogenate au dat rezultate destul de contradictorii (1). Fără îndoială că un progres în acest domeniu îl constituie cercetările pe fracțiuni subcelulare izolate.

Cu toate că mitocondriile din ficatul de șobolan sînt cercetate intens (2, 3), studiile pe mitocondrii izolate din ficatul uman sînt puține (4–8). Acest gen de studii sînt importante pentru a arăta diferențele dintre mitocondriile din ficatul normal și cele din boli hepato-biliare sau din boli în care metabolismul general este perturbat (diabet zaharat, hiperlipidemie). Interesul este cu atît mai mare cu cît s-au observat modificări ale mitocondriilor în boli ca ictere, ciroză hepatică (5, 6), condiții în care pot interfera agenți ca bilirubina și acizii biliari, cunoscuți pentru efectele lor nocive pe alte tipuri de mitocondrii (9, 10).

În lucrări anterioare s-a descris un procedeu reproductibil de izolare a mitocondriilor din ficatul uman din fragmente mici de țesut obținute prin biopsie chirurgicală; s-a arătat că particularitățile structurale ale mitocondriilor din ficatul uman impun condiții speciale la izolarea și studiul proprietăților enzimatice (11–16). S-a efectuat de asemenea o caracterizare imunochimică a mitocondriilor izolate din ficatul uman (17).

Scopul lucrării de față este de a prezenta unii parametri biochimici mitocondriali care prezintă interes în condiții patologice.

MATERIAL ȘI METODE

Material clinic. Grupul de studiu a cuprins pacienți care au fost operați pentru ulcer gastric sau duodenal, colecistită, litiază biliară, hernie ombilicală sau epigastrică. Afectarea ficatului s-a apreciat pe baza

semnelor clinice, a probelor de rutină a funcţiilor hepatice (bilirubină, testul timol, transaminazele serice) şi a examenului histologic efectuat pe o parte a fragmentului utilizat în determinările biochimice. Ţesutul hepatic a fost prelevat prin biopsie intraoperatorie după cum s-a descris anterior (16).

Prepararea mitocondriilor. Izolarea mitocondriilor s-a făcut după procedeul descris de G. Benga (16), iar în final mitocondriile au fost suspendate în soluţie de zaharoză 75 mM, manitol 225 mM, Tris-HCl *) 10 mM (pH 7,4), la o concentraţie finală proteică de circa 20 mg/ml.

Consumul de oxigen s-a determinat spectrofotometric prin metoda Bârzu şi col. (18, 19), adaptată pentru cantităţi mici de material biologic (20). Unele experienţe de control au fost făcute prin tehnica manometrică Warburg, dînd aceleaşi rezultate. Măsurătorile au fost efectuate la 430 nm cu spectrofotometrul VSU-1 (C. Zeiss, Jena), în cuvă de 0,3 cm (drumul razei de lumină), aflată într-un bloc termostat la 37°C. Mediul de reacţie conţinea (volum final 1 ml): zaharoză 10 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 16 mM (pH 7,4), EDTA 2,5 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, tampon fosfat 5 mM (pH 7,4), NaF 10 mM, 10 mg albumină şi 0,04 mEq HbO_2.

Controlul respirator a fost măsurat sub forma controlului acceptor (C.A.) egal cu raportul dintre consumul de oxigen după adăugarea ADP şi consumul de oxigen iniţial, înainte de adăugarea ADP. Alte detalii privind măsurarea spectrofometrică a consumului de oxigen au fost descrise anterior (20).

Determinarea activităţii adenozintrifosfatazei mitocondriale (ATP-aza, E C 3.6.1.3) s-a efectuat urmărind fosfatul anorganic eliberat prin hidroliza ATP la 37°C în 10 minute. Mediul de reacţie (volum final 0,2 ml) cuprinde: tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), zaharoză 200 mM, KCl 50 mM, EDTA 0,5 mM, ATP 5 mM şi 0,1 mg proteină mitocondrială. La acest mediu de bază s-au adăugat în diferite experienţe Mg^{2+} (5 mM), DNP (0,1 mM) şi albumină serică bovină 2 mg/probă. În cazul cînd s-au studiat efectele diferitelor concentraţii de zaharoză şi de KCl s-au folosit concentraţii de zaharoză de 100—400 mM şi de KCl de 20—400 mM. Reacţia s-a oprit prin adăugarea de 0,1 ml acid tricloracetic 20%, iar în filtrat s-a determinat fosfatul anorganic. Activitatea ATP-azică s-a exprimat în moli de substrat hidrolizat per minut şi per mg de proteină mitocondrială.

Alte procedee. Purificarea oxihemoglobinei şi degresarea serumalbuminei s-au făcut aşa cum s-a descris anterior (16). Dozarea fosfatului anorganic s-a făcut după metoda Lowry şi Lopez (21). Dozarea proteinelor s-a făcut prin metodele Gornall (22), Lowry (23) şi prin dozarea azotului proteic prin metoda Kjeldahl, descrisă de Manta şi Ciplea (24).

REZULTATE

Valorile de referinţă ale activităţilor respiratorii ale mitocondriilor izolate din ficatul uman sînt redate în tabela 1. După cum se observă, în condiţiile de incubare utilizate, consumul de oxigen cu succinat este de

*) S-au folosit următoarele prescurtări: DNP = 2,4-dinitrofenol; EDTA = acid etilendiaminotetraacetic; HbO_2 = oxihemoglobină; Tris = trihidroximetilaminometan.

Tabela 1

Activitățile respiratorii ale mitocondriilor izolate din ficatul uman normal[a)]

Substratul	Nr. exp.	Consum de oxigen	Control acceptor
Succinat	9	90,0±6,1[b)]	4,44±0,70[b)]
Glutamat	10	30,8±6,2	2,40±0,64
Piruvat + malat	7	24,1±4,3	2,15±0,57
Izocitrat + malat	9	37,4±4,2	3,70±0,54
Alfa-cetoglutarat + + malat	6	28,8±0,4	2,73±0,34
Aspartat	4	21,6±3,5	2,10±0,15

a) Condițiile experimentale sînt descrise în text. Consumul de oxigen este exprimat în nAtomi/ min/mg proteină mitocondrială, iar controlul acceptor este raportul dintre respirația mitocondriilor în starea 3 (cu 0,2 mM ADP) și respirația în starea 4 (înainte de adăugarea ADP).

b) Media și eroarea standard a mediei.

0—100 nAtomi/min/mg proteină mitocondrială, iar cu substratele NAD-dependente de 25—40 nAtomi/min/mg proteină.

Profilul activității ATP-azice a mitocondriilor izolate din ficatul uman normal este următorul: activitate bazală mică, stimulare mică prin Mg^{2+} și stimulare marcată prin DNP (tabela 2).

Tabela 2

Activitatea ATP-azică a mitocondriilor izolate din ficatul uman normal[a)]

	Fără albumină		Cu albumină	
Activitate bazală	15,4 ± 2,1[b)]	(4)[c)]	9,0 ± 1,2	(4)
Mg^{2+} 5 mM	37,8 ± 3,2	(8)	28,8 ± 4,5	(5)
DNP	141,1 ± 10,2	(8)	157,1 ± 11,5	(8)

a) Mediul de incubare (volum final 0,2 ml) conținea: ATP 5 mM, zaharoză 150 mM, KCl 50 mM, Tris-acetat (pH 8,5) 50 mM, EDTA 0,5 mM; concentrația DNP a fost de 0,1 mM în absența albuminei și 0,4 mM în prezența albuminei (1% concentrație finală). Activitatea ATP-azică este exprimată canmoli fosfat/ min/mg proteină mitocondrială.

b) Media și eroarea standard a mediei.

c) Numărul de observații.

Activitățile respiratorii ale mitocondriilor din ficatul uman în colecistopatii. În acest grup s-au inclus bolnavii cu afecțiuni biliare, care, clinic și la examinările de laborator, aveau ficatul normal.

Aspectul țesutului la prelevare și al omogenatului era diferit de cel de la bolnavii operați pentru ulcere gastrice sau duodenale, avînd o culoare brună-cenușie. Modificarea culorii se datorează conținutului mai mare de lipide, care dealtfel se și adună la suprafața tubului de centrifugă în cursul sedimentării nucleilor și a mitocondriilor. Cu toate acestea, consumul de oxigen și controlul respirator nu sînt modificate, în cazul în care mediul de omogenizare și de respirație conțin albumină (tabela 3).

Activitățile respiratorii ale mitocondriilor din ficatul uman în hepatopatii. La bolnavii cu suferință hepatică evidențiată clinic (hepatită în antecedente, sindrom dispeptic, hepatomegalie) și prin testele de explorare

Tabela 3

Activitatea mitocondriilor izolate de la bolnavii cu afecțiuni biliare și ficatul indemn a)

Substratul	Nr. exp.	Consum de oxigen	Control acceptor
Succinat	6	80,0 ± 14,0 b)	3,1 ± 0,5
Piruvat + malat	5	22,6 ± 6,3	2,9 ± 0,3
Glutamat	5	31,0 ± 10,0	2,9 ± 0,2
Izocitrat + malat	4	42,0 ± 4,0	3,0 ± 0,6

a) Condițiile experimentale sînt descrise în text. Consumul de oxigen (starea 3, cu 0,2 mM ADP) este exprimat în nAtomi/min/mg proteină, iar controlul acceptor este raportul dintre respirația în starea 3 și respirația înainte de adăugarea ADP.

b) Media și eroarea standard a mediei.

hepatică (proteinograma, transaminazele, bilirubinemia modificate) am constatat un consum de oxigen mai scăzut, în special cu substratele NAD-dependente. De asemenea, controlul respirator era scăzut, chiar în prezența albuminei serice degresate. Modificările sînt mai acccentuate în cazul icterelor prin hepatită prelungită (tabela 4).

Tabela 4

Activitatea mitocondriilor izolate de la bolnavi cu ictere prin hepatită prelungită a)

Substratul	Nr. exp.	Consum de oxigen	Control respirator
Succinat	4	66,0 ± 20,0 b)	1,9 ± 0,5
Piruvat + malat	4	14,7 ± 4,3	1,7 ± 0,2
Glutamat	4	14,4 ± 6,8	1,7 ± 0,1
Izocitrat + malat	2	19,5	1,8

a) Condițiile experimentale sînt descrise în text. Consumul de oxigen (cu 0,2 mM ADP) exprimat în nAtomi/min/mg proteină, iar controlul respirator este raportul dintre respirația mitocondriilor în prezență de ADP și respirația înainte de adăugarea ADP.

b) Media și eroarea standard a mediei.

Concomitent s-a observat o umflare spontană a mitocondriilor în zaharoză 250 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), ceea ce nu apare, după Avi-Dor (25), decît în cazul mitocondriilor alterate. Umflarea indusă de fosfat a fost puternică, dar la introducerea ATP și a Mg^{2+} nu s-a produs contracția mitocondriilor, ceea ce confirmă alterarea lor. În sfîrșit, aspectul electrono-microscopic al mitocondriilor în țesut și al celor izolate demonstrează modificările patologice ale mitocondriilor în aceste cazuri. Aspectele morfologice sînt prezentate separat.

În cazul icterelor mecanice prin litiază biliară, afectarea mitocondriilor apare numai dacă durata icterului depășește trei luni. În cazul unui icter de durată mai scurtă, dacă izolarea și testarea mitocondriilor se face în prezența serumalbuminei, consumul de oxigen și controlul respirator prezintă valori apropiate de martori. În absența albuminei valorile consumului de oxigen și ale controlului respirator sînt mult scăzute (tabela 5).

Tabelu 5

Activitatea mitocondriilor în cazul icterelor de scurtă durată [a]

Substratul	Exp. nr.	Fără albumină	Cu albumină
Succinat	1	48[b] (1,7)[c]	86 (3,2)
	2	—	91 (1,8)
Piruvat + malat	1	7,5 (1,1)	17,5 (2,3)
	2	—	19,7 (1,9)
Alfa-cetoglutarat + malat	1	10,8 (sub 1)	21,3 (1,5)
	2	—	27,5 (2,1)

a) Condițiile experimentale sînt descrise în text.

b) Consumul de oxigen în starea 3 (cu 0,2 mM ADP), exprimat în nAtomi/min/mg proteină.

c) Controlul respirator exprimat ca raportul dintre respirația mitocondriilor în starea 3 și respirația înainte de adăugarea ADP.

Activitatea ATP-azică ca test de suferință mitocondrială. Stimularea marcată a activității ATP-azice de către DNP, față de o stimulare mică prin Mg^{2+}, este considerată de majoritatea autorilor ca un indicator al integrității mitocondriale, indiferent de sursa de mitocondrii pe care se lucrează (26, 27). De aceea, determinarea activității ATP-azice a mitocondriilor din ficatul uman în condiții patologice prezintă interes.

Adaosul albuminei serice la mediul de incubare pentru determinarea ATP-azei mitocondriale permite diferențierea unei suferințe „reversibile" a mitocondriilor, de o suferință „ireversibilă" (fig. 1). Astfel, în cazul ficatului gras din colecistopatii, în absența albuminei activitatea Mg-ATP-azei este mai mare ca a DNP-ATP-azei, ca și în cazul mitocondriilor lezate. În prezența albuminei serice degresate (1% concentrație finală) raportul DNP-ATP-ază/Mg-ATP-ază este reversat, fiind aproape de valoarea pe care o are în cazul mitocondriilor integre. Acest aspect l-am numit suferință „reversibilă" a mitocondriilor, care concordă și cu datele consumului de oxigen și ale controlului respirator în prezența serumalbuminei.

În cazul suferinței „ireversibile" a mitocondriilor adaosul de albumină serică nu reușește să restabilească profilul normal al activității ATP-azice; profilul patologic este caracterizat prin valori mari ale activității bazale și ale Mg-ATP-azei și prin o stimulare mică la adaosul de DNP în concentrație optimă. Acest profil apare în cazul bolilor

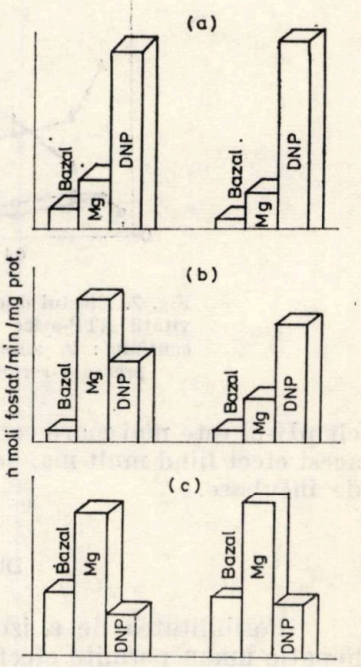


Fig. 1. Profilul activității ATP-azice a mitocondriilor izolate din ficatul uman normal (*a*), în cazul suferinței „reversibile" (*b*) și în cazul suferinței „ireversibile" (*c*).

hepatice însoţite de modificări ale testelor de rutină ale funcţiilor hepatice. După cum s-a arătat, în aceste cazuri şi consumul de oxigen şi controlul respirator sînt modificate.

Pentru a se obţine însă o stimulare maximă cu DNP este necesar să se lucreze la concentraţia optimă de DNP, care variază în funcţie de pH şi de prezenţa în mediul de incubare a serumalbuminei (fig. 2). Cu

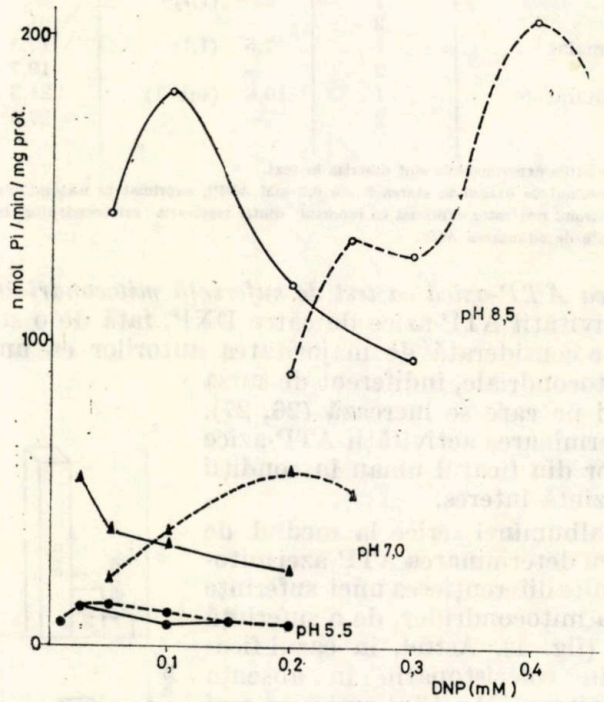


Fig. 2. Efectul diferitelor concentraţii de DNP asupra activităţii ATP-azice a mitocondriilor din ficatul uman. Linia continuă: în absenţa serumalbuminei; linia întreruptă: în prezenţa serumalbuminei (1% concentraţie finală).

cît pH-ul este mai mare concentraţia optimă a DNP este şi ea mai mare, acest efect fiind mult mai accentuat dacă se adaugă şi albumină în mediul de incubare.

DISCUŢIA REZULTATELOR

Posibilitatea de a izola mitocondrii din fragmente mici de ţesut hepatic uman permite efectuarea unor studii metabolice variate pe fracţiuni subcelulare, clarificînd în felul acesta datele contradictorii constatate pe omogenate. În colecistopatii, în care ficatul nu părea modificat clinic şi la examinările de laborator, s-a remarcat creşterea conţinutului lipidic al mitocondriilor, fără modificarea consumului de oxigen, a controlului respirator, dacă izolarea mitocondriilor şi testarea activităţilor respiratorii se fac în prezenţă de albumină serică degresată (1% concentraţie finală).

Aceste aspecte nu au fost încă semnalate în literatură, în puținele lucrări existente asupra mitocondriilor din ficatul uman, bolnavii cu afecțiuni biliare și ficatul aparent indemn fiind considerați martori.

Există o singură lucrare asupra mitocondriilor hepatice umane în icterele mecanice produse prin coledocolitiază sau carcinom de cap de pancreas (5). Autorii semnalează un consum de oxigen scăzut cu alfa-cetoglutarat și piruvat-malat, dar nu și cu succinat, scăderea controlului respirator și creșterea ATP-azei. În determinările noastre am constatat scăderea consumului de oxigen cu toate substratele, dar mai ales cu cele NAD-dependente, și scăderea controlului acceptor. Aceste modificări nu apar însă în toate cazurile de icter mecanic, dacă se lucrează în prezență de albumină serică 1%, ceea ce arată avantajul metodei noastre de izolare și studiere a mitocondriilor din ficatul uman, care înlătură posibilitatea unor artefacte experimentale. Efectele albuminei serice adăugate la izolare au fost discutate anterior (16).

Lucrări efectuate pe mitocondrii din diferite surse au arătat că mitocondriile integre prezintă o activitate ATP-azică mică („latența" ATP-azei), pe cînd oxidarea substratelor este cuplată cu fosforilarea ADP (26, 27). Activatorul ATP-azei mitocondriilor integre este DNP (28). Cînd mitocondriile sînt alterate (de exemplu prin îmbătrînire, șoc osmotic, adaos de ioni de Ca sau detergenți, îngheț-dezgheț) activarea ATP-azei prin DNP este pierdută și o activare simultană prin Mg^{2+} apare predominantă. Aceste date fac ca studiul activității ATP-azice a mitocondriilor izolate din ficatul uman în condiții patologice să fie foarte important. Alegerea concentrației optime de DNP în funcție de pH și de prezența albuminei serice apare necesară datorită legării DNP pe albumină. Este interesant că diferența dintre concentrația optimă a DNP în absența și în prezența albuminei crește odată cu creșterea pH-ului. La prima vedere, acest fapt ar putea fi atribuit unei legări mai puternice a fenolului nedisociat, deoarece punctul izoelectric al albuminei serice este 4,7 (29). Totuși, legarea altor substanțe (acizi grași, bilirubină) pe mitocondrii este de asemenea mai mare la pH alcalin. Probabil că capacitatea de legare a albuminei este datorită modificărilor conformaționale ale moleculei, care sînt pH dependente (30) (31). Pe de altă parte, albumina serică poate fi adsorbită pe membranele mitocondriale, modificînd permeabilitatea pentru DNP.

Descreșterea activității DNP cu creșterea pH-ului (concentrația optimă mai mare) sugerează că activatorul este fenolul nedisociat (32), care descrește în concentrație o dată cu creșterea pH-ului. Totuși, Myers și Slater (32) nu admit un rol pentru fenolul nedisociat, deoarece DNP și p-nitrofenolul au aceeași eficiență în decuplarea fosforilării oxidative, deși au valorile pK de 4 și respectiv 7. Hemker (33) sugerează că influența fenolilor asupra activității ATP-azice nu depinde de concentrația lor în faza apoasă, ci de concentrația în faza lipidică din mitocondrii. Liposolubilitatea DNP este de 320 ori mai mare decît cea a p-nitrofenolului, pe cînd forma ionizată (ionul fenolat) al acestor compuși este aproape insolubil în lipide.

Adăugarea albuminei serice la mediul de incubare pentru determinarea ATP-azei (ceea ce nu s-a utilizat pînă acum) permite diferențierea unei suferințe „reversibile" de una „ireversibilă" a mitocondriilor. Dacă

după adăugarea albuminei activitatea bazală şi Mg-ATP-aza scad şi DNP-ATP-aza creşte, astfel încît raportul DNP-ATP-ază/Mg-ATP-ază devine mai mare decît 1, poate fi vorba de o suferinţă „reversibilă". Aceasta poate apare şi în cursul omogenizării ţesutului şi al izolării mitocondriilor, prin acţiunea nocivă a bilirubinei, acizilor biliari, acizilor graşi liberi sau datorită activării fosfolipazelor şi lipazelor din mitocondrii (34), lizozomi (35) şi microzomi (36). Efectele protectoare ale albuminei se datoresc interacţiunii cu membranele biologice, fiind cunoscute unele efecte interesante ale albuminei asupra unor activităţi enzimatice ale membranelor (37,3) şi asupra unor fenomene superficiale şi interfaciale (39).

În cazul suferinţei „ireversibile" a mitocondriilor profilul normal de activitate ATP-azică nu poate fi obţinut nici prin adaos de albumină. Această suferinţă este probabil datorită unei alterări in vivo a mitocondriilor.

CONCLUZII

1. La bolnavii cu colecistopatii consumul de oxigen şi controlul respirator nu sînt modificate, în prezenţa albuminei serice degresate. În cazul bolilor hepatice s-a observat un consum de oxigen scăzut cu substratele NAD-dependente.

2. Activitatea ATP-azică bazală, stimulată de Mg şi de DNP, constituie un indicator sensibil de suferinţă mitocondrială. Adaosul albuminei serice la mediul de incubare permite diferenţierea unei suferinţe reversibile de una ireversibilă.

MULŢUMIRI

Autorul este îndatorat tov. chim. dr. Letiţia Mureşan şi tov. chim. dr. Adrian Hodârnău pentru ajutorul acordat în efectuarea unor experienţe.

Primit la redacţie la 22 aprilie, 1974

Disciplina de biochimie
I.M.F. Cluj-Napoca

SUBCELLULAR FRACTIONATION OF HUMAN LIVER

II. CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIA IN PATHOLOGICAL CONDITIONS

SUMMARY

The oxygen uptake with the NAD-linked substrates and the respiratory control index were lowered in cases of liver diseases and especially in cases of prolonged jaundice.

The determination of ATP-ase activity as a test of mitochondrial damage should be performed at pH 8.5 measuring the basal activity, Mg-ATP-ase and DNP-ATP-ase in the absence of albumin (with 0.05—0.1 mM DNP) and in the presence of albumin (with 0.25—0.4 mM DNP at pH 8.5). Mitochondria isolated from normal human liver presented a

low basal activity, a small stimulation by Mg^{2+} and a high stimulation by DNP. In case of a "reversible" damage of mitochondria Mg-stimulated activity can be greater than the DNP-stimulated ATP-ase without albumin and a reversal of the ratio DNP-ATP-ase/Mg-ATP-ase is obtained in the presence of albumin. In pathological conditions an "irreversible" damage of mitochondria was noted. This is characterized by high values of the basal activity and of the Mg-ATP-ase, while the stimulation by DNP is small whether albumin is added or not.

BIBLIOGRAFIE

1. Schmidt E., Schmidt F. W., Enzym. biol. clin., **11**, 67 (1970).
2. Green D. E., Brucker R. F., BioScience, **22**, 13 (1972).
3. Sjöstrand F. S., J. Ultrastruct. Res., **32**, 293 (1970).
4. Pagliaro L., Notarbartolo A., Mannino V., Migneco G., J. Lab. Clin. Med., **62**, 185 (1963).
5. Scherstén T., Björkerud G., Jakoi L., Björntorp P., Scand. J. Gastroenterol., **1**, 284 (1966).
6. Henley K. S., Napier E. A., Kreyden R. W., Corssen G. C., Berensohn S., J. Lab. Clin. Med., **64**, 306 (1964).
7. Björntorp P., Björkerud S., Scherstén T., Biochim. Biophys. Acta, **111**, 375 (1965).
8. Ozawa K., Kitamura O., Mizukami T., Yamaoka Y., Kamano T., Takeda H., Takasan H., Honjo Y., Clin. Chim, Acta, **38**, 385 (1972).
9. Zetterstrom R., Ernster L., Nature, **178**, 1335 (1956).
10. Mustafa M. G., Cowger M. L., King T. E., J. Biol. Chem., **244**, 6403 (1969).
11. Benga G., Tărmure C., Hodârnău A., Enzyme, **12**, 574 (1971).
12. Benga G., Mureşan L., Dancea S., Abstr. Commun. 7th Meet. Eur. Biochem. soc., 1971, p. 233.
13. Benga G., Mureşan L., Hodârnău A., Dancea S., Biochem. Med., **6**, 508(1972).
14. Benga G., Mureşan L., Biochem. Med. (sub tipar)..
15. Benga G., Hodârnău A., Mureşan L., Böhm B., Abstr. 9th Int. Congress Biochem., Stockholm, 1973, p. 223.
16. Benga G., St. cerc. biochim., (sub tipar).
17. Benga G., St. cerc. biochim., **16**, 251 (1973).
18. Bârzu O., Borza V., Anal. Biochem., **21**, 344 (1967).
19. Bârzu O., Mureşan L., Tărmure C., Anal. Biochem., **24**, 249 (1968).
20. Bârzu O., Mureşan L., Benga G., Anal. Biochem., **46**, 374 (1972).
21. Bârzu O., Cioară P., Anal. Biochem., **43**, 630 (1971).
22. Gornall A. G., Bardawiil C. J., David M. M., J. Biol. Chem., **177**, 751 (1949).
23. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A., Randall R. J., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
24. Manta I., Ciplea Al., *Metodele laboratorului clinic*, Cartea Românească, Cluj, p. 94—97.
25. Avi-Dor Y., Biochim. Biophys. Acta, **39**, 53 (1960).
26. Kielley W. W., Kielley R. K., J. Biol. Chem., **191**, 485 (1951).
27. Wainio W. W., *The Mammalian Mitochondrial Respiratory Chain*, Academic Press, New York, London, 1970, p. 385—387.
28. Lardy H. A., Wellman H., J. Biol. Chem., **201**, 357 (1953).
29. Mazur A., Harrow B., *Textbook of Biochemistry*, 10th edition, W. B. Saunders, Philadelphia-London-Toronto, 1971, p. 46.
30. Chen R. F., J. Biol. Chem., **242**, 173 (1967).
31. Krasner J., Biochem. Med., **7**, 135 (1963).
32. Myers D. K., Slater E. C., Biochem J., **67**, 558 (1957).
33. Hemker H. C., Biochim. Biophys. Acta, **63**, 46 (1962).
34. Nachbaur J., Vignais P., Biochem. Biophys. Res. Commun., **33**, 315 (1968).
35. Fowler S., De Duve C., J. Biol. Chem., **244**, 471 (1969).
36. Bjornstad P., Biochim. Biophys. Acta, **116**, 500 (1966).
37. Rothfield L., Romeo D., în *Structure and Function of Biological Membranes*, L. I. Rothfield edit., Academic Press, New York, London 1971, p. 251—282.
38. Triggle D. J., în *Recent Progress in Surface Science* (J. F. Danielli, A. c. Riddiford, M. D., Rosenberg, edit.), Academic Press, New York, London, 1970, vol. 3, p. 273—288.
39. Quinn P., Dawson R. M. C., Biochem. J., **179**, 21 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 93–97 (1975)

IONII DE POTASIU, SODIU ŞI CALCIU ÎN SUCURILE OBŢINUTE DIN FRUNZELE NEIRADIATE ŞI IRADIATE CU RAZE ULTRAVIOLETE

SIMONA-AMELIA CEAUŞESCU

Rezumat. — Iradierea cu raze uv a frunzelor de varză albă şi porumb modifică în general concentraţia ionilor cercetaţi în sucurile menţionate. Cele mai importante modificări se produc la nivelul ionilor de potasiu, a căror concentraţie scade în toate sucurile obţinute din frunze iradiate. Aceasta se datoreşte, probabil, fixării acestor ioni la nivelul componentelor biostructurii activate prin iradiere, precum şi pe alte formaţiuni intracelulare. Concentraţiile ionilor de calciu şi de sodiu suferă modificări mai puţin importante şi nu în toate sucurile, ceea ce arată că în frunzele vii, sub acţiunea razelor uv, se modifică raporturile dintre ionii de potasiu, calciu şi sodiu conţinuţi în biostructură şi în lichidul celular. Faptul că modificările în concentraţia ionilor cercetaţi atît în sucurile vacuolare cît şi în cele plasmatice provocate prin iradierea frunzelor cu raze uv se anihilează cu timpul, arată că aceste modificări sînt reversibile.

Studiul repartiţiei ionilor de potasiu, calciu şi sodiu între biostructură şi lichidul intracelular, la frunzele de porumb, a confirmat că în biostructură proporţia ionilor de potasiu depăşeşte cu mult pe aceea a ionilor de calciu şi, mai ales, a ionilor de sodiu, că repartiţia acestor ioni în diferitele porţiuni ale biostructurii nu este uniformă şi că destrămarea biostructurii, survenită odată cu moartea, duce la punerea în libertate atît a apei, cît şi a ionilor cuprinşi în ea (1), (2).

Pornind de la constatările de mai sus, şi date fiind efectele excitante pe care radiaţiile ultraviolete le exercită asupra ţesuturilor vii, ne-am propus să cercetăm dacă, şi în ce măsură, aceste radiaţii influenţează conţinutul în ioni de potasiu, calciu şi sodiu al sucului vacuolar provenit din frunze proaspete, neiradiate şi iradiate cu raze ultraviolete, precum şi al sucului plasmatic provenit din stoarcerea reziduurilor, după îngheţarea la —7°C.

MATERIAL ŞI METODĂ

Ca material de cercetat am ales frunze de varză albă (Brassica oleracaea L. var. capitata D.C.f. alba), scoase din căpăţîni, şi frunze de porumb (Zea mays) hibrid 409 în vîrstă de 20 de zile. Probele zilnice erau constituite din cîte 50 de grame material vegetal, format din jumătăţi de frunze despicate de-a lungul nervurii principale, astfel că jumătăţile din dreapta alcătuiau martorul iar cele din stînga materialul iradiat.

Pentru iradiere am utilizat o lampă de ultraviolete „Solimed Quartzlampe Bruno Höpfel Mecklemburg", la care am expus materialul de cercetat timp de 10 minute la o distanţă de 0,5 m.

Aceste probe se storceau unele imediat, iar celelalte la trei şi respectiv 24 ore de la iradiere (paralel am lucrat şi cu probe neiradiate).

Pentru a evita o eventuală evaporare a apei conținută în țesut, pînă la prelucrare, probele erau ținute în pungi de material plastic.

Sucul s-a obținut cu ajutorul unei prese hidraulice de mînă prin stoarcere la 150 atmosfere timp de 10—15 minute. Prin stoarcerea frunzelor proaspete obțineam sucul vacuolar, iar din reziduul rămas în presă și congelat la —7°C timp de 24 de ore obțineam, după dezghețare, printr-o nouă stoarcere în aceleași condiții, sucul plasmatic. Sucul a fost diluat cu apă bidistilată în raportul 1/20 și în el s-a determinat cu ajutorul fotometrului cu flacără concentrația ionilor de potasiu, calciu și sodiu (2), exprimat în mg/100 ml suc nediluat.

REZULTATELE OBȚINUTE

Pentru a verifica dacă cele două probe similare (alcătuite una din jumătățile din dreapta și a doua din cele din stînga frunzelor) dau rezultate comparabile, am efectuat o serie de determinări fără a recurge la iradiere. Unele rezultate pe frunzele de porumb și de varză albă (tab. 1), arată că în sucurile vacuolare ale probelor similare concentrațiile ionilor de potasiu, calciu și sodiu sînt asemănătoare pentru fiecare cation în parte, dar variază, după cum era de așteptat, de la o specie la alta.

Altfel se prezintă situația în cazul sucurilor plasmatice. Concentrația ionilor de potasiu la sucurile ambelor specii de plante este asemănătoare; aceea a ionilor de calciu prezintă valori foarte apropiate de acelea ale

Tabela 1

Concentrația ionilor de K, Ca și Na (mg/100 ml suc) în sucurile obținute din frunze neiradiate (suc vacuolar) și în sucurile obținute din reziduurile respective după înghețare prealabilă la —7°C (suc plasmatic).

Nr. exp.	Frunze		Suc vacuolar			Suc plasmatic		
			K+	Ca++	Na+	K+	Ca++	Na+
1	Porumb	dreapta	840	32	10	850	33	13
		stînga	880	30	12	820	31	12
2		dreapta	860	32	13	830	30	13
		stînga	820	34	12	850	31	14
1	Varză albă	dreapta	61	13	1,0	650	15	12
		stînga	67	13	1,0	700	16	11
2		dreapta	65	12	1,5	700	17	11
		stînga	61	11	1,0	670	18	13

sucului vacuolar. Pentru ionul de sodiu putem spune că în timp ce sucurile vacuolare obținute din frunzele celor două specii prezintă deosebiri mari, sucurile plasmatice au valori asemănătoare.

Trecînd la cercetări pe probe de frunze neiradiate și iradiate, constatăm că iradierea cu raze ultraviolete modifică concentrațiile unora dintre ioni atît în structurile vacuolare, cît și în cele plasmatice (tab. 2).

La probele de frunze iradiate, în sucurile obținute, concentrația ionilor de potasiu este mai mică decît în sucurile obținute din probe similare neiradiate. Iradierea frunzelor nu modifică concentrația ionilor de calciu în sucurile vacuolare. Concentrația ionilor de sodiu nu este modifi-

cată de razele ultraviolete în sucurile vacuolare de varză, dar se micşorează în cele de porumb. Valorile ionilor din sucurile plasmatice obţinute din frunze neiradiate şi din cele iradiate sînt asemănătoare pentru potasiu la porumb, dar mai mici pentru frunzele iradiate de varză. Calciul şi sodiul au valori asemănătoare la ambele specii.

Tabela 2

Concentraţia ionilor de K, Na şi Ca (mg/100 ml suc) în sucurile obţinute din frunze neiradiate şi iradiate cu raze ultraviolete stoarse imediat după iradiere şi din sucurile obţinute din reziduurile respective după îngheţare prealabilă la −7°C (suc plasmatic).

Nr. exp.	Frunze			Suc vacuolar			Suc plasmatic		
				K+	Ca++	Na+	K+	Ca++	Na+
1	Porumb	dr.	neiradiat	900	32	12	850	30	12
		st.	iradiat	360	28	8,0	770	21	15
2		dr.	neiradiat	880	34	11	870	31	10
		st.	iradiat	380	36	9,7	840	25	13
3	Varză albă	dr.	neiradiat	93	13	2,5	610	29	13
		st.	iradiat	82	13	2,7	300	22	38
4		dr.	neiradiat	85	14	2,9	730	32	13
		st.	iradiat	80	13	2,7	290	14	31

Pentru a stabili cum evoluează în timp comportarea ionilor de potasiu, calciu şi sodiu în frunzele neiradiate şi în cele iradiate, am efectuat aceleaşi analize pe sucurile stoarse din frunze iradiate fie după trei ore, fie după 24 ore de la iradiere (tab. 3). În sucurile vacuolare obţinute din

Tabela 3

Concentraţia ionilor de K, Ca şi Na (mg/100 ml suc) în sucurile obţinute din frunze neiradiate şi iradiate cu raze ultraviolete stoarse la 3 şi 24 ore de la iradiere (suc vacuolar) şi din sucurile obţinute din reziduurile îngheţate la −7°C (suc plasmatic)

Nr. exp.	ore de la irad.	Frunze			Suc vacuolar			Suc plasmatic		
					K+	Ca++	Na+	K+	Ca++	Na+
1	3 ore de la irad.	Porumb	dr.	neirad.	730	30	10,2	490	32	18
			st.	iradiat	500	30	8,8	870	42	13
2			dr.	neirad.	730	31	9,0	570	43	10
			st.	iradiat	480	37	10,1	790	31	16
3		Varză albă	dr.	neirad.	26	18	3,5	250	14	2,8
			st.	iradiat	23	18	2,8	220	10	2,5
4			dr.	neirad.	24	19	3,2	240	13	2,6
			st.	iradiat	22	13	3,5	220	16	2,9
5	24 ore de la iradiere	Porumb	dr.	neirad.	510	39,5	8,3	850	22	9,0
			st.	iradiat	440	29	11	830	19	11
6			dr.	neirad.	370	26,5	7,4	730	42	9,7
			st.	iradiat	530	52	9,9	790	39	7,0
7		Varză albă	dr.	neirad.	13	10	2,1	220	12	2,8
			st.	iradiat	18	11	2,2	190	10	2,2
8			dr.	neirad.	15	10	2,5	210	10,8	2,6
			st.	iradiat	11	11	2,2	195	10	2,4

frunze iradiate de porumb după 3 ore de la iradiere, concentrația ionilor de potasiu rămîne inferioară celei din sucurile vacuolare ale frunzelor martor. Concentrația ionilor de potasiu în sucurile vacuolare obținute după 3 ore de la iradiere din frunze de varză are valori ceva mai mici decît la probele martor. În sucurile vacuolare stoarse după 24 ore de la iradiere, concentrația ionilor de potasiu este mult apropiată de aceea martorilor, atît la frunzele de porumb cît și la cele de varză. Rezultă că scăderea concentrației ionilor de potasiu constatată la sucurile vacuolare de porumb și de varză imediat după iradiere este un fenomen trecător. Aceasta se datorește, probabil, răspunsului mai intens al biostructurii frunzelor de porumb la acțiunea razelor ultraviolete. Concentrația ionilor de potasiu în sucurile plasmatice este asemănătoare aceleia din sucurile vacuolare, dar cu o tendință de egalare a acestei concentrații pe măsură ce timpul trece.

În cazul ionilor de calciu, nici sucurile vacuolare, nici cele plasmatice, obținute din frunze de porumb și varză neiradiate sau iradiate, stoarse după 3 și 24 ore de la iradiere nu prezintă deosebiri semnificative.

O comportare asemănătoare cu aceea a ionilor de calciu o întîlnim și în cazul ionilor de sodiu. Unele deosebiri constatate în concentrația ionilor de sodiu a unor sucuri obținute imediat după iradiere se anihilează cu timpul, așa că la sucurile vacuolare și plasmatice stoarse după 3 și 24 ore de la iradiere, concentrațiile acestor ioni devin practic egale cu acelea din sucurile martor, micile deosebiri căzînd în limitele erorilor experimentale.

Așadar, razele ultraviolete modifică raporturile ionilor din biostructură și din soluția intraplasmatică. Modificările ce survin depind atît de particularitățile biostructurii plantei respective, cît și de specificul ionilor luați în considerație. Datele obținute nu permit alte precizări în acest domeniu; interesant este însă că raporturile între ioni și biostructură se modifică sub acțiunea razelor ultraviolete altfel decît sub acțiunea inhibitorilor metabolici (3), (4), sau a curentului electric (5), aceasta depinzînd, probabil, și de comportarea apei biostructurale în cazul intervenției celor trei agenți.

CONCLUZII

Determinînd conținutul în ioni de potasiu, calciu și sodiu în sucurile vacuolare și plasmatice obținute din frunze de Brassica oleracaea și Zea mays, s-a constatat că ionii menționați se găsesc atît în lichidul celular cît și în biostructura țesutului foliar al celor două specii. Iradierea cu raze ultraviolete, în condițiile experiențelor efectuate de noi, influențează în mod deosebit raporturile dintre acești ioni.

Prezentat la redacție la
4 ianuarie 1974

Facultatea de biologie
Universitatea București

POTASSIUM, SODIUM AND CALCIUM IONS IN JUICES OBTAINED FROM UNIRRADIATED AND IRRADIATED LEAVES WITH U.V. RAYS

SUMMARY

In general, the irradiation of the white cabbage and corn by means of U.V. rays modifies the concentration of investigated ions on juices. The most important of them is K, which decreases in all juices obtained from rayed leaves. This is probably due to the fixation of these ions on the components of biostructure activated by irradiation and also on the other intracellular components. The concentration of Ca and Na ions gets less important modifications but not in all juices. This means that in the leaves left alive after the U.V. rays' action, it modifies the relations between K, Ca and Na contained in biostructure and cellular juice. The fact that the modifications occurring in the concentration of investigated ions in vacuolar as well as well as in plasmatic juices brought about by the irradiation of the leaves by means of U.V. rays become null in the course of time shows that such modifications are reversible.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Biotsructura*, Ed. Acad. R.S.R. Buc. 1969.
2. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **5**, 257 (1968).
3. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
4. M. Rabega, St. cerc. biochim., **14**, 14 (1971).
5. I. Cornoiu, St. cerc. biochim., **14**, 17 (1971).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 99–102 (1975)

PEROXIDAZA DIN COLEOPTILII DE PORUMB

IOANA HAGIMA

Rezumat. — Sa cercetat prin metode cromatografice, electroforetice, izoelectrice şi imunochimice peroxidaza din coleoptilii de porumb şi s-a constatat, în linii mari, identitatea sa cu peroxidaza din frunze, cercetată anterior. Particularităţile semnalate sînt considerate a fi induse de complexitatea fenomenului de diferenţiere celulară ce însoţeşte evoluţia vegetativă a plantei.

Cercetările din ultimii ani au confirmat, prin diverse metode de separare, eterogenitatea moleculară a peroxidazei vegetale. Investigaţiile efectuate în laboratorul nostru au fost îndreptate asupra peroxidazei din porumb, incluzînd analize electroforetice (1), (2), imunochimice (1), (3), cromatografice şi izoelectrice (4).

În lucrări anterioare ne-am ocupat de distribuţia formelor moleculare ale peroxidazei din frunzele de porumb (1), (2). Studiul de faţă l-am întreprins asupra peroxidazei din coleoptili, urmărind în ce măsură formele moleculare din acest organ sînt sau nu comune cu cele din frunze. Comparaţia s-a realizat prin cromatografia extractului iniţial, urmată de electroforeza maximelor enzimatice obţinute, alături de analiza lor imunochimică şi izoelectrică.

MATERIAL ŞI METODE

Materialul vegetal. S-a lucrat pe coleoptili de seminţe de porumb (Zea mays, H. D. 310) obţinute de la I.C.C.P.T. — Fundulea şi germinate la întuneric, în condiţii de laborator, timp de 6 zile. Extracţia s-a făcut în soluţie de NaCl 0,9%, în raport 1/1. Extractele proteice s-au concentrat cu carbowax, tip 20000.

Cromatografia s-a efectuat pe CM-Sephadex C-50, în gradient discontinuu de tampon acid acetic-acetat de sodiu, pH 4,4. Pe coloană s-au aplicat 8,5 ml extract proteic brut, concentrat, conţinînd 2100 γ proteină/ml.

Determinarea activităţii peroxidazei din eluate s-a făcut colorimetric, după metoda lui Macnicol (5).

Dozarea proteinei a urmat metoda descrisă de Lowry şi modificată de Miller (6), albumina serică bovină servind drept standard.

Electroforeza peroxidazei din extractul iniţial şi din maximele enzimatice obţinute la cromatografie s-a descris anterior (4).

Analiza imunochimică s-a realizat în gel de agar, preparat în soluţie de NaCl 0,9%, reacţiile de imunodifuzie desfăşurîndu-se faţă de un ser imun anti-frunză de porumb. Liniile de precipitare cu activitate enzimatică s-au revelat cu benzidină, preparată după metoda lui Bojarkin (7).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Extractul proteic iniţial din coleoptili s-a separat la cromatografia pe CM-Sephadex C-50 în trei maxime peroxidazice, denumite convenţional, în ordinea eluţiei lor, *A*, *B* şi *C*. Primul maxim, *A*, reprezintă fracţiunea enzimatică neadsorbită de cationitul utilizat (fig. 1). Acest maxim cores-

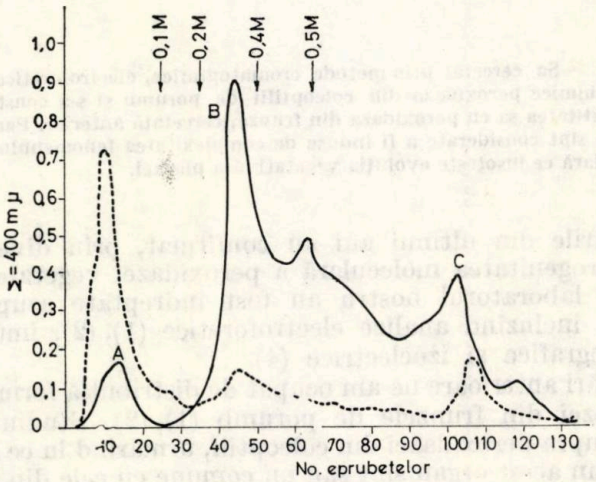


Fig. 1. Profilul de eluţie al peroxidazei din coleoptili de porumb pe CM-Sephadex C-50, în tampon acid acetic — acetat de sodiu, 0,005 M, pH 4,4. Săgeţile indică adăugarea tamponului de diferite concentraţii :

——— peroxidaza ; -•- proteina (0,1/curbă = 1000 γ prot/ml).

punde celui proteic, reprezentînd aproximativ 10% din activitatea enzimatică iniţială. Cel de-al doilea maxim, *B*, s-a eluat în tampon acid acetic — acetat de sodiu 0,2 M, pH 4,4, şi a cuprins aproximativ 50% din activitatea peroxidazică aplicată coloanei. Componentul cromatografic *C* s-a eluat în acelaşi tampon, de acelaşi pH, dar 0,5 M, şi a conţinut aproximativ 20% din activitatea enzimatică iniţială.

Comparativ cu separarea peroxidazei din frunze, relevăm următoarele : în ambele organe s-a evidenţiat acelaşi număr de trei maxime cromatografice, asemănătoare şi ca distribuţie a activităţii peroxidazei. Primele două maxime s-au eluat la molarităţi de tampon identice pentru ambele organe, pe cînd al treilea s-a eluat în tampon 0,4 M în cazul frunzei, respectiv în tampon 0,5 M în cazul coleoptililor.

Peroxidaza din extractul brut de coleoptili s-a fracţionat prin electroforeza în agar în opt forme moleculare (fig. 2, I). Maximele cromatografice *A* şi *B*, supuse electroforezei, au relevat cîte trei forme moleculare peroxidazice, iar maximul *C* a evidenţiat două forme moleculare. Maximul cromatografic *A*, neadsorbit, conţine cu preponderenţă formele moleculare ale peroxidazei brute, situate la electroforeză de la start spre anod. Se remarcă că în locul celor trei fracţiuni cu mobilităţi diferite, evidenţiate în cazul extractului brut, apare doar o fracţiune cu activitate enzimatică intensă. Maximul cromatografic *B* relevă, în principal, două forme mole-

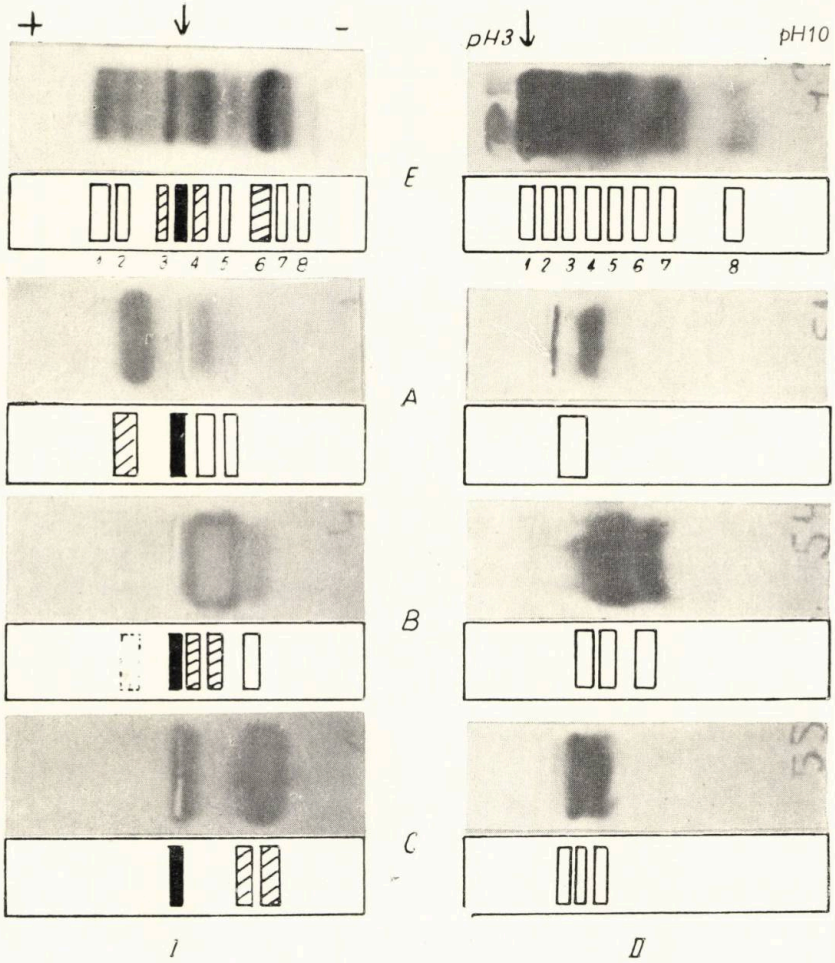


Fig. 2, I. Electroforegramele în agar ale maximelor peroxidazice obținute la cromatografie :

___ originea ; *E* – extract inițial ; *A* – maximul *A* ; *B* – maximul *B* ; *C* – maximul *C*.

II. Focalizarea izoelectrică în agaroză a maximelor cromatografice, în gradient de pH 3—10. Notațiile maximelor ca în figura 2, I.

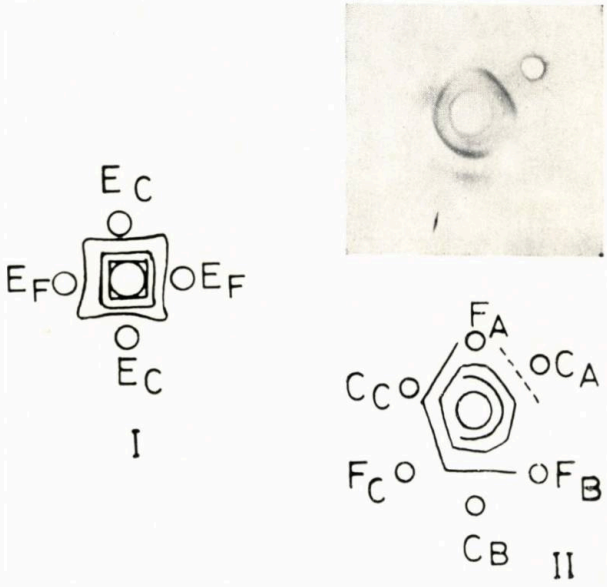


Fig. 3. Dubla difuzie în gel de agar a extractelor inițiale din coleoptili (E_C) și din frunze (E_F) și a maximelor cromatografice față de un ser imun antifrunză de porumb :

F_A – maximul A din frunze ; F_B – maximul B din frunze ; F_C – maximul C din frunze ; C_A – maximul A din coleoptili ; C_B – maximul B din coleoptili ; C_C – maximul C din coleoptili.

culare, evidenţiate şi în maximul *A* doar ca urme, şi, în plus, conţine o a treia formă moleculară, cu activitate peroxidazică redusă. Maximul cromatografic *C* e reprezentat de ultimile două fracţiuni dinspre catod.

Comparînd peroxidaza din frunze cu cea din coleoptili, sub aspectul formelor moleculare evidenţiate electroforetic, se poate constata o asemănare în distribuţia acestora. Se remarcă şi deosebiri ca număr, al formelor moleculare dintr-un grup, dar acestea decurg, desigur, din complexitatea procesului de transformare a coleptililor din frunze.

Am recurs şi la focalizarea izoelectrică, datorită sensibilităţii şi înaltei sale rezoluţii, pentru a caracteriza formele moleculare ale peroxidazei din coleoptili şi după punctele lor izoelectrice. Extractul proteic iniţial, electrofocalizat în agaroză, în domeniul de pH 3,0—10,0, a evidenţiat opt benzi peroxidazice, cu punctele izoelectrice situate în intervalul de pH 3,5—7,5. Aprecierea punctelor izoelectrice s-a făcut după poziţia pe placă a benzilor (fig. 2, II). La frunză, formele moleculare ocupă intervalul de pH 4,0—8,0 (4). Constatăm în cazul frunzei o uşoară deplasare spre domeniul alcalin pe care o atribuim evoluţiei vegetative a plantei. Maximul enzimatic *A* din coleoptili e reprezentat numai de o singură formă moleculară, al cărei punct izoelectric este în jur de pH 4,5. Maximul enzimatic *B*, conţine trei forme moleculare, ale căror puncte izoelectrice sînt distribuite în domeniul de pH 4,8—6,3. Cel de-al treilea maxim peroxidazic a relevat trei forme moleculare, ale căror puncte izoelectrice au ocupat intervalul de pH 4,5—5,9. O comportare complet diferită se observă în cazul peroxidazei separate din cele două organe în maximul cromatografic *C* (fracţiunea enzimatică din frunze are punctul izoelectric situat la pH 6, 7). Cazurile în care numărul formelor moleculare separate electroforetic nu corespunde celui depistat prin focalizare izoelectrică ne conving de faptul că cele două metode se bazează pe parametri de separare diferiţi.

Analiza imunochimică (dubla difuzie) în gel de agar a peroxidazei, din cele două organe, faţă de un ser imun anti-frunză totală de porumb, a urmărit, pe de o parte, comparaţia între extractele iniţiale de coleoptili şi de frunze şi, pe de altă parte, între maximele cromatografice obţinute din cele două organe. Liniile de precipitare cu activitate peroxidazică ale celor două extracte iniţiale se dispun sub forma a trei pătrate concentrice, demonstrînd prezenţa a trei grupe diferite de izoenzime, atît în cazul coleoptililor, cît şi în acela al frunzelor (fig. 3, I). Aceste trei grupe de izoenzime sînt identice la cele două organe comparate. Dubla difuzie a peroxidazei din maximele cromatografice a arătat o repartizare diferită a izoenzimelor (fig. 3, II). Astfel maximul *A* din coleoptili conţine, în principal, două izoenzime (notate 2 şi 3 dinspre godeul cu antigene spre cel cu anticorpi), maximul *B* toate cele trei izoenzime, iar maximul *C* e reprezentat de două izoenzime (I şi 2).

Corelînd rezultatele obţinute prin cele patru metode de separare utilizate, constatăm că fiecare maxim cromatografic are specific un anumit grup de izoenzime. Maximului cromatografic *A* îi corespunde izoenzima localizată lîngă godeul cu antiser, maximului *B* îi corespunde izoenzima intermediară, iar maximului *C* îi este specifică izoenzima situată lîngă godeul cu antigene. Din figura 3 se remarcă faptul că frunzele conţin aceleaşi izoenzime ca şi coleoptilii.

CONCLUZII

1. — Activitatea peroxidazei din coleoptilii de porumb s-a separat la cromatografia pe CM-Sephadex C-50 în trei maxime enzimatice, dintre care două identice cu cele din frunză, iar al treilea cu afinitate mai mare pentru adsorbent.

2. — Cele trei maxime cromatografice au relevat enzimograme specifice.

3. — Formele moleculare ale peroxidazei din coleoptili au punctele izoelectrice cuprinse în intervalul de pH 3,5—7,5, diferite de cele din frunze.

4. — Analiza imunochimică a peroxidazei din coleoptilii și din frunzele de porumb a ilustrat identitatea din punct de vedere antigenic atît a enzimei din extractele brute, cît și a formelor moleculare separate cromatografic.

Prezentat la redacție
la 15 iulie 1974

Departamentul de biochimie
al
Institutului de științe biologice
București

PEROXIDASE OF MAIZE COLEOPTILES

SUMMARY

Peroxidase from maize coleoptiles was investigated by chromatographical, electrophoretical, isoelectrical and immunochemical methods and, in general, its identity with leaves peroxidase studied in a previous work was established. The peculiarities observed are considered to be induced by the complexity of the phenomenon of cellular differentiation which accompanies vegetative evolution of plant.

BIBLIOGRAFIE

1. Victoria Alexandrescu, Ioana Călin, Rev. roum. biochim., *6*, 171 (1969).
2. Ioana Hagima-Călin, St. cerc. biochim., *13*, 47 (1970).
3. Victoria Alexandrescu, Ioana Hagima, Rev. roum. biochim., *10*, 15 (1973).
4. Ioana Hagima, St. cerc. biochim., *16*, 371 (1973).
5. P. K. Macnicol, Arch. Biochem. Biophys., *117*, 347 (1966).
6. G. L. Miller, Analyt. Chem., *31*, 964 (1959).
7. A. N. Bojarkin, Biohimia, *16*, 352 (1951).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 103–107, (1975)

EFECTUL ADMINISTRĂRII DE DIMETOXI-TRICLOR-HIDROXI-ETIL FOSFONAT (NEGUVON) ŞI N-METIL-1-NAFTIL CARBAMAT (CARBARIL) ASUPRA UNOR REACŢII ENZIMATICE, LA ŞOBOLANUL ALB

A. ICHIM, ILEANA DINU, EUGENIA RADOVICI, ELENA CRISTEA, LIANA BOGHIANU, ILEANA MIHĂILESCU

Rezumat. — În experienţe efectuate pe 30 de şobolani albi tineri, care au primit în hrană, timp de 72 de zile, doze subacute de 10 ppm. „Neguvon" şi 100 ppm „Carbaril", s-a urmărit creşterea animalelor şi activitatea unor enzime din ficat, creier, sînge total şi ser.

Rezultatele obţinute arată că administrarea Neguvon-ului a determinat inhibiţia colinesterazei (CE) şi a catalazei din sînge, creşterea activităţii lactat dehidrogenazei (LDH) şi a aril sulfatazei serice şi a glutation reductazei (GR) din ficat. Administrarea Carbaril-ului a determinat inhibiţia activităţii fosfomonoesterazei hepatice, a catalazei şi CE sanguine şi a mărit activitatea GR hepatice şi a LDH serice.

Aceste mofificări de activitate enzimatică reflectă apariţia unor leziuni biochimice, în absenţa unor semne clinice caracteristice stării de intoxicare.

Majoritatea studiilor de toxicodinamie consacrate substanţelor din clasele esteri fosforici şi esteri carbamici se referă la proprietatea specifică acestora de a inhiba, practic ireversibil, activitatea colinesterazelor ca urmare a unei modificări a enzimei prin fosforilare şi respectiv carbamilare.

Dar esterii fosforici şi carbamici pot interfera şi în activitatea altor sisteme enzimatice inhibînd sau inducînd activităţile acestora.

Aceste fenomene posibile, aparent secundare în comparaţie cu modul principal de acţiune, capătă o importanţă primordială în intoxicaţia subacută, inaparentă prin semne clinice, situaţie în care numai punerea în evidenţă a modificării unor reacţii enzimatice poate fi un indicator sensibil. În sprijinul acestei aprecieri se află şi observaţia potrivit căreia simptomele intoxicaţiei cu esteri fosforici sau carbamici apar abia atunci cînd activitatea colinesterazei scade cu 80%.

Pe aceste considerente şi urmărind cunoaşterea modului complex de acţiune, studiul experimental pe animale de laborator, ce face obiectul acestei lucrări, a pornit de la următoarea ipoteză :

Substanţele insecticide din clasele esteri fosforici (Neguvon) şi esteri carbamici (Carbaril), administrate prin ingerare, în doze repetate, subacute, pot determina efecte de inducţie sau inhibiţie enzimatică. Aceste efecte, ce pot fi puse în evidenţă prin măsurarea activităţii unor enzime reprezentative pentru fiecare clasă de reacţii de metabolizare, permit înţelegerea modului în care substanţele respective acţionează ca toxice. În funcţie de leziunea biochimică şi de semnificaţia efectului determinat, activitatea unor enzime poate fi luată în considerare ca indicator precoce al stării de intoxicaţie subacută sau cronică, în absenţa semnelor clinice.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele au fost efectuate pe un număr de 30 şobolani albi, tineri (din aceeaşi generaţie), de vîrstă şi greutate apropiată, care au primit în hrană, timp de 72 de zile, o cantitate de 10 ppm Neguvon (O,O, dimetoxi-O-(1-hidroxi, 2-tricloretil)-fosfonat) şi 100 ppm Carbaril (N-metil-1-naftil-carbamat). Substanţele insecticide pure au fost incluse în hrană sub formă de soluţie în ulei de floarea soarelui.

Tot timpul perioadei de intoxicare s-a efectuat proba de creştere (cîştigul în greutate, ingesta şi eficienţa hranei), iar la sfîrşitul acesteia animalele au fost supuse unei puncţii cardiace pentru prelevarea sîngelui, apoi au fost sacrificate prin decapitare extrăgînd ficatul şi creierul. Pe ţesuturile prelevate s-au efectuat determinările de activitate ale următoarelor enzime: lactat dehidrogenaza (LDH) (1), rezultatele exprimîndu-se în μ moli piruvat/g/h, lactat dehidrogenaza serică (2), rezultatele exprimîndu-se în unităţi Wroblewski, sorbitol dehidrogenaza (SDH) (3), rezultatele exprimîndu-se în unităţi SDH/100 mg. ficat, aril-sulfataza (4), rezultatele exprimîndu-se în μ moli paranitrofenol/g/h sau μ moli/ml ser/h, glutation reductaza (GR) (5), rezultatele exprimîndu-se în μ moli GSSG reduşi/h/mg ţesut sau μ moli GSSG reduşi/h/ml ser, fosfataza alcalină (6), rezultatele exprimîndu-se în μ moli PO_4^{-3}/g/20min, catalaza serică (7), rezultatele exprimîndu-se în cifra de catalază, adenozin trifosfataza de transport (NA^+, K^+ ATP-aza) (8), ca diferenţă dintre activitatea ATP-azică totală şi activitatea ATP-azică ouabain insensibilă, cu rezultatele exprimate în μ moli PO_4^{-3}/g/h, colinesteraza (CE) din sînge total (9), rezultatele exprimîndu-se în Δ pH/h sau procente de inhibiţie.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Valorile cifrice obţinute în condiţiunile experimentale descrise sînt date în tabelul de la pag. 105.

Administrarea Neguvonului (10 ppm) şi Carbarilului (100 ppm) timp de 72 de zile nu a influenţat creşterea şobolanilor, greutatea finală a lotului martor fiind foarte apropiată de a loturilor supuse intoxicaţiei.

Din examinarea rezultatelor se observă că odată cu inhibiţia (32%) clasică a activităţii colinesterazei survin şi alte modificări, ce evidenţiază leziuni biochimice şi celulare la nivelul ficatului, fără ca acestea să apară prin semne clinice de perturbare a stării generale de sănătate a animalelor. Se constată astfel, o creştere importantă a activităţii GR în ficat (77%), a LDH în ser (85%) şi a aril sulfatazei în ser (66%), şi o scădere semnificativă a catalazei sanguine. SDH, fosfataza alcalină şi ATP-aza (din ficat, ser şi creier) nu prezintă modificări semnificative. Creşterea activităţii LDH serice şi inhibiţia activităţii catalazei, determinată, probabil, de scăderea sintezei hepatice a enzimei, evidenţiază leziuni biochimice funcţionale şi celulare la nivelul ficatului.

Apariţia în ser a aril sulfatazei (la 40% din şobolanii intoxicaţi) se poate explica prin eliberarea acestei enzime din ficat şi trecerea ei în ser, ca urmare a unui proces de inducţie. Tot ca proces de inducţie se poate explica şi valoarea crescută a activităţii GR în ficat. Aceste observaţii concordă cu datele din literatură asupra mecanismului de detoxifiere a esterilor fosforici, la care participă enzime microzomale hepatice (10).

Tabel

Influența Neguvonului și Carbarilului asupra activității unor enzime din ficat, creier, singe și ser.

ENZIMA		MARTOR				„NEGUVON"				„CARBARIL"			
		Ficat	Ser	Creier	Sînge	Ficat	Ser	Creier	Sînge	Ficat	Ser	Creier	Sînge
LDH	M	4295	236	—	—	3681	437	—	—	3739	515	—	—
	ES	672	58,5	—	—	631	57,1	—	—	730	47,3	—	—
	P					> 0,05	< 0,02	—	—	> 0,05	< 0,001	—	—
SDH	M	328	—	—	—	306	—	—	—	296	—	—	—
	ES	60,8	—	—	—	30,6	—	—	—	25,4	—	—	—
	P					> 0,05	—	—	—	> 0,05	—	—	—
Acril Sulfataza	M	51,8	36	—	—	49,9	60	—	—	55,1	104	—	—
	ES	6,5	—	—	—	4,5	—	—		5,1	—	—	—
	P					> 0,05	—	—	—	> 0,05	—	—	—
GR	M	102,8	354,0	21,0	—	183,0	324	22,5	—	163,4	333,0	22,7	—
	ES	14,0	19,4	0,89	—	10,8	25,7	0,90	—	15,1	36,0	0,85	—
	P					< 0,001	> 0,05	> 0,05	—	< 0,005	> 0,05	< 0,05	—
Fosfataza alcalină	M	22,0	9,0	—	—	23,2	6,0	—	—	16,9	6,9	—	—
	ES	1,88	1,21	—	—	2,94	1,43	—	—	1,43	1,62	—	—
	P					> 0,05	> 0,05	—	—	< 0,04	> 0,05	—	—
Catalaza	M	—	24,7	—	—	—	21,3	—	—	—	19,7	—	—
	ES	—	1,04	—	—	—	0,48	—	—	—	1,01	—	—
	P						< 0,005	—	—	—	< 0,001	—	—
ATP-aza	M	—	—	400	—	—		442	—	—	—	400	—
	ES	—	—	11,1	—	—	—	25,5	—	—	—	17,0	—
	P							> 0,05				> 0,05	
CE ΔpH/*h* (valori medii)	Activ				0,25	—			0,17	—			0,13
	inh.				100 %				68 %	—			52 %
					0				32 %				48 %

În cazul Carbarilului, modificările de activitate enzimatică se pot corela cu modificări funcţionale ce apar înaintea semnelor clinice caracteristice intoxicaţiei. Astfel, inducţia GR hepatice (creştere 59%) demonstrează o intensificare a proceselor de detoxifiere, cunoscut fiind rolul acestui sistem enzimatic în îndepărtarea peroxizilor proveniţi din metabolizarea compuşilor străini. Creşterea foarte mare (118%) a activităţii LDH în ser arată că la doza de 100 ppm ester carbamic are loc o eliberare a enzimei din celulele hepatice şi, prin aceasta, evidenţa unor leziuni celulare. Inhibiţia activităţii fosfatazei alcaline (25%) în ficat şi a colinesterazei sanguine (48%) corespunde reacţiilor competitive de carbamilare a centrelor esteratice ale enzimei. În cazul catalazei sanguine inhibiţia (23%) s-ar putea datora tot unui efect specific al carbamaţilor asupra peroxidazelor.

Interferenţa Carbarilului în activitatea enzimelor hepatice, aşa cum arată şi rezultatele noastre, concordă cu observaţiile altor cercetători (11) care explică mărirea duratei somnului produs de barbiturice, după administrarea prealabilă a unor doze 1/8—1/2 DL_{50} Sevin (sinonim cu Carbaril), ca fiind urmarea inhibării proceselor de oxidare microzomală.

CONCLUZII

Administrarea repetată a Neguvon-ului în doză de 10 ppm, la şobolanii albi, timp de 72 de zile, determină inhibiţia colinesterazei şi catalazei în sînge, activarea LDH în ser şi GR în ficat şi eliberarea în ser a aril sulfatazei.

În aceleaşi condiţii, Carbaril-ul în doză de 100 ppm inhibă activitatea fosfomonoesterazei hepatice, a catalazei şi CE sanguine şi măreşte activitatea GR hepatice şi LDH serice.

Aceste modificări de activitate enzimatică reflectă (în cazul ambelor substanţe insecticide) apariţia unor fenomene de blocare a centrelor esteratice prin reacţii competitive de fosforilare şi carbamilare, leziuni biochimice, inducţie enzimatică, leziuni celulare hepatice, în absenţa unor semne clinice caracteristice stării de intoxicare.

Prezentat la redacţie
la 7 august 1974.

Institutul de igienă şi sănătate publică
şi
Institutul de medicină şi farmacie
Bucureşti.

EFFECT OF DIMETHOXY-TRICHLOROHYDROXYETHYL PHOSPHONATE (NEGUVON) AND N-METHYL -1-NAPHTYL CARBAMATE (CARBARYL) ON SOME ENZYMATIC REACTIONS IN RAT TISSUES

SUMMARY

The influence in 30 young white rats of the administration of 10 ppm Neguvon and 100 ppm Carbaryl (in different groups) on the growth test and on some hepatic, brain, blood and serum enzymes activity was tested. The experiments have been performed during 72 days.

The results obtained show that the administration of Neguvon has determined the inhibition of the activity of blood cholinesterase (CE) and catalase, the increase of the activity of the serum lactate dehydrogenase (LDH) and of aryl-sulphatase and of liver glutathione reductase (GR).

The administration of Carbaryl has determined the inhibition of the activity of the liver phosphomonoesterase, of blood CE and catalase and the increase of the activity of the liver GR and of serum LDH.

These changes of enzymes activities show the occurrence of some biochemical lesions, without any clinical characteristic signs of the state of intoxication.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Weber, J. Nutr., **71**, 156 (1960).
2. H. U. Bergmeyer, *Methods of Enzimatic Analysis*, Academic Press, New York, 1963, p. 736.
3. U. Gerlach, *Methods of Enzimatic Analysis*, Academic Press, New York, 1963, p. 761.
4. D. W. Milson, F. A. Rose, K. S. Dodgson, Biochem. J., **128**, 331 (1972).
5. H. D. Horn, *Methods of Enzimatic Analysis*, Academic Press, New York, 1963, p. 875.
6. T. J. Franklin, Biochem. J., **82**, 118 (1962).
7. A. N. Bah, Sbron. Trud. Himii i Biohimii. Izd. AN. SSSR, Moskva (1960).
8. A. Schwartz, Biochim. Biophys. Acta, **66**, 329 (1963).
9. Mc. Donald Jr., G. B. Polard, A. H. Gropp, Amer. Med. Assoc. Arch. Ind. Hyg., **6**, 271 (1962).
10. V. D. Parke, *The Biochemistry of Foreign Compounds*, Pergamon Press, New York, 1968, p. 112.
11. J. F. Stevens, R. E. Strtzel, J. J. Mc. Phyllips, J. Pharmacol. Exp. Therap. **181**, 576 (1972).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 109–113 (1975)

CERCETĂRI CHEMOTAXONOMICE LA PLANTE INFERIOARE

I. PIGMENȚII CAROTENOIDICI ȘI CLOROFILIENI DIN *CYMBELLA CYMBIFORMIS KÜTZ*

GH. ILLYES, G. NEAMȚU, C. BODEA

Rezumat. — Dintre pigmenții carotenoidici s-au indentificat β-carotina, luteina și fucoxantina, care constituie pigmentul principal și caracteristic, cu importanță chemotaxonomică. S-au pus în evidență de asemenea două carotenoide secundare, încă neidentificate, care au proprietăți asemănătoare diatoxantinei și diadinoxantinei.

Dintre pigmenții clorofilieni s-au identificat clorofila *a* și clorofila *c*.

Conținutul pigmenților carotenoidici și clorofilieni din *Cymbella cymbiformis* variază mult sub influența factorilor de mediu. Deosebirile sînt de ordin cantitativ, nu și calitativ.

Plantele inferioare reprezintă o sursă importantă pentru obținerea unor pigmenți naturali cu structură moleculară cît mai variată. Prin utilizarea unor metode moderne de investigație în studiul pigmenților carotenoidici s-a reușit să se descopere în ultimii ani, în plantele inferioare și în unele animale marine, noi tipuri de carotenoide (1)—(3). Dintre acestea, cele mai importante sînt carotenoidele cu structură aromatică, alenică, acetilenică, carotenoidele glicozidice, norcarotenoidele, carotenoidele cu peste 40 de atomi de carbon în moleculă etc. (4)—(9). Datorită existenței noilor tipuri de carotenoide numai în anumite grupe de plante și de animale, s-au intensificat în ultimele două decenii cercetările chemotaxonomice (3, 6, 10, 11). În prezent s-au stabilit carotenoide specifice și caracteristice pentru diferite grupe de ciuperci, alge, bacterii etc. (3, 6) (8)—(10), (12).

Diatomeele, deși constituie un grup numeros de plante inferioare, cunoscîndu-se în prezent peste 6000 de specii (13), sînt foarte puțin cercetate sub aspectul pigmenților ce-i conțin.

În prezenta lucrare s-au cercetat pigmenții carotenoidici și clorofilieni din diatomeea *Cymbella cymbiformis*, specie care se găsește larg răspîndită în țara noastră și care n-a fost cercetată, pînă în prezent sub acest aspect.

MATERIAL ȘI METODE

Cymbella cymbiformis Kütz este o diatomee microscopică, care trăiește în colonii, ce formează un strat gelatinos de culoare brună *). Se găsește în albia unor pîraie, pe pietre umede, în ape dulci și, în general,

* Determinarea speciei s-a făcut de Dr. Peterfi Leontin Ștefan, de la Centrul de cercetări biologice din Cluj-Napoca căruia îi mulțumim pentru ajutorul acordat.

în locuri umede. S-a recoltat din pîrîul Lomb, care se găseşte în partea estică a municipiului Cluj-Napoca. Recoltarea materialului s-a făcut între anii 1971—1974, în a doua jumătate a lunii martie, cînd coloniile se văd cu uşurinţă şi prezintă o mare puritate biologică.

După recoltare, materialul este analizat la microscop şi sortat, astfel încît coloniile din care se extrag pigmenţii să fie formate în întregime din specia cercetată. Materialul ales pentru analiză se pune într-un sac de pînză deasă şi se presează cu ajutorul unei prese manuale, aplicînd o presiune de 4—5 kgf/cm^2, pentru îndepărtarea excesului de apă. În urma presării materialului se obţine o pastă, care serveşte la extragerea pigmenţilor.

Extragerea s-a făcut cu un amestec de eter de petrol şi acetonă, în raport de 8 : 2. Extractul primar se spală de 10—12 ori cu o soluţie de clorură de sodiu 30% şi apoi de 20—25 ori cu apă distilată. Se trece pe urmă la separarea, identificarea şi determinarea pigmenţilor.

Separarea pigmenţilor carotenoidici s-a făcut cu ajutorul cromatografiei în coloană, utilizînd ca adsorbant oxid de magneziu şi praf de sticlă fin, în raport de 1—3 în greutate. S-a folosit oxid de magneziu p.a. nr. 5865 obţinut de la firma Merk-Darmstadt. Coloanele cromatografice s-au developat cu amestec de eter de petrol şi acetonă, în proporţie crescîndă, de la 0,1 pînă la 10%.

Pentru separarea pigmenţilor clorofilieni s-a folosit ca material adsorbant praf de celuloză microcristalin nr. 5540, obţinut de la firma Serva-Heidelberg. Developarea coloanelor cromatografice cu pigmenţii clorofilieni s-a făcut cu amestec de eter de petrol şi benzen, în proporţie crescîndă de 5—30%.

După developare se face decuparea mecanică a zonelor şi eluarea separată a pigmenţilor, cu amestec format din eter de petrol şi etanol, în proporţie de 10%.

Identificarea pigmenţilor s-a făcut prin aceleaşi metode ca şi în lucrările anterioare (11, 15). Pentru cromatograme de amestec cu pigmenţii autentici s-a folosit şi cromatografia în strat subţire, monodimensională şi bidimensională, după metoda lui Grob şi colaboratorii (16), utilizînd ca adsorbant oxid de magneziu obţinut de la firma Union Chimique Belge S.A. Developarea plăcilor cromatografice s-a făcut prin irigări repetate cu neofalină şi la sfîrşit cu un amestec format din neofalină-alcool etilic-cloroform, în care proporţia alcoolului şi a cloroformului a crescut treptat pînă la raportul de 3 : 1 : 2.

Dozarea pigmenţilor s-a făcut fotocolorimetric, cu ajutorul unui fotocolorimetru FEK-M, prin metoda curbelor de etalonare, cu pigmenţi naturali şi sintetici. Determinările s-au raportat la substanţa uscată.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Cromatograma şi conţinutul procentual al pigmenţilor carotenoidici şi clorofilieni din *Cymbella cymbiformis* se prezintă în tabela 1.

Din determinările efectuate reiese că *Cymbella cymbiformis* are un conţinut ridicat şi variat în pigmenţi carotenoidici. Pigmentul principal şi caracteristic, cu importanţă chemotaxonomică, este fucoxantina, care conţine în moleculă o grupare alenică. Sub aspect cantitativ fucoxantina reprezintă 38,81% din totalul pigmenţilor şi 55% din cei carotenoidici.

Alături de fucoxantină, care reprezintă pigmentul predominant, se găsește luteină, β-carotina și doi pigmenți carotenoidici secundari, încă neidentificați. Aceștia au proprietăți asemănătoare cu diatoxantina și diadinoxantina, care sînt carotenoide cu structură acetilenică.

Tabela 1

Cromatograma (4×40 cm.) și conținutul procentual al pigmenților carotenoidici și clorofilieni din colonii de *Cymbella cymbiformis*.

Lățimea zonei în cm	Culoarea	Pigmentul	Maximele de observație în et. de petrol pt. carotenoide și et. etilic pt. clorofile, în mm.	Conținutul procentual din totalul pigmenților
0,3	verde închis	Pigmenți clorofilieni de degradare		4,50%
0,5	verde deschis	Clorofila *c*	443, 577, 5, 626	4,68%
1,0	interzonă			
2,5	verde albăstrui	Clorofila *a*	420, 580, 620, 660	20,30%
2,0	interzonă			
3,5	galben-cărămiziu	Fucoxantină	417, 456, 478	38,81%
1,5	interzonă			
2,0	luteină	Galben	475, 444	16,43%
0,5	interzonă			
0,3	roz-cărămiziu	Pigment neidentificat (diadinoxantină?)	447, 476	1,69%
0,8	roz-portocaliu	Pigment neidentificat (diatoxantin?)	452, 479	3,55%
2,0	interzonă			
1,4	portocaliu	β-carotină	478, 450	10,04%

Apare ca un aspect semnificativ faptul că în *Cymbella cymbiformis*, alături de carotenoidele cu sistem polienic normal (β-carotina, luteina), se găsesc carotenoide cu structură alenică (fucoxantina) și, probabil, și cu structură acetilenică (pigmenții neidentificați).

Dintre pigmenții clorofilieni s-au identificat clorofila *a*, clorofila și pigmenți de degradare ai clorofilelor (clorofilide, clorofiline, feoforbide etc.). Nu s-a pus în evidență clorofila *b*, așa cum era de așteptat, deoarece acest pigment nu apare în diatomee.

Pentru a stabili în ce măsură factorii de mediu, care nu sînt identici de la un an la altul, influențează conținutul pigmenților din *Cymbella cymbiformis*, s-au extins cercetările pe o perioadă de timp mai mare. În tabela 2 se prezintă conținutul pigmenților carotenoidici și clorofilieni din coloniile de *Cymbella cymbiformis* recoltate în anii 1971, 1972 și 1973.

Conținutul pigmenților din *Cymbella cymbiformis* variază mult sub influența factorilor de mediu. Deosebirile care apar în conținutul pigmenților de la un an la altul sînt însă numai de ordin cantitativ, nu și calitativ, și deci nu au o semnificație deosebită.

Tabela 2

Conţinutul pigmenţilor carotenoidici şi clorofilieni din colonii de *Cymbella cymbiformis*, recoltate în anii 1971–1973, în mg/100 g

PIGMENŢI	Anul de recoltare a coloniilor de *Cymbella cymbiformis*			Cantitatea medie de pigmenţi, în mg la 100 g material uscat
	1971	1972	1973	
A. Pigmenţi carotenoidici. β-carotină	113,20	179,80	168,60	153,86
Pigment roz-portocaliu. (diatoxantina ?)	35,74	95,34	57,60	62,90
Pigment roz-cărămiziu (diadinoxantina ?)	17,86	40,16	30,20	29,40
Luteina	207,40	379,60	276,00	287,67
Fucoxantina	782,00	918,00	650,40	783,47
Total pigmenţi carotenoidici	1156,20	1612,90	1182,80	1317,30
B. Pigmenţi clorofilieni. Clorofila *a*	376,60	432,00	342,00	383,53
Clorofila *c*	108,40	156,80	80,10	115,10
Pigmenţi clorofilieni de degradare (clorofilide, clorofiline, feoforbide etc.)	86,30	120,00	75,50	93,94
Total pigmenţi clorofilieni	571,30	708,80	497,6	592,57
Total pigmenţi carotenoidici şi clorofilieni	1727,50	2321,70	1680,40	1909,87

Conţinutul relativ mai ridicat al pigmenţilor din materialul recoltat în 1972 se datoreşte unei desprimăvărări mai timpurii, cînd coloniile de *Cymbella cymbiformis* au avut suficientă umiditate, lumină şi căldură. În luna martie 1974, din cauza condiţiilor climaterice vitrege, coloniile de *Cymbella cymbiformis* nu au manifestat o puritate biologică corespunzătoare şi nu s-au putut efectua determinări cantitative.

Din cercetările efectuate reiese că coloniile de *Cymbella cymbiformis* constituie o sursă însemnată pentru obţinerea fucoxantinei şi a celorlalţi pigmenţi identificaţi. Deoarece aceste colonii sînt bogate în pigmenţi carotenoidici, în special în fucoxantină, ele pot fi utilizate cu succes în hrana păsărilor, pentru colorarea gălbenuşului de ou.

CONCLUZII

Coloniile de *Cymbella cymbiformis* au un conţinut bogat şi variat în pigmenţi carotenoidici. Pigmentul principal şi caracteristic, cu importanţă chemotaxonomică, este fucoxantina. Alături de acest pigment se găseşte luteina, β-carotina şi două carotenoide neidentificate, cu proprietăţi asemănătoare diatoxantinei şi diadinoxantinei.

Dintre pigmenţii clorofilieni s-au identificat clorofila *a* şi clorofila *c*.

Conţinutul pigmenţilor carotenoidici variază într-o proporţie accentuată sub influenţa factorilor de mediu. Deosebirile care apar sînt numai de ordin cantitativ, nu şi calitativ.

Prezentat la redacţie la
31 iulie 1974

Catedra de biochimie
Institutul agronomic „Dr. P. Groza"
Cluj-Napoca

CHEMOTAXONOMIC INVESTIGATIONS ON LOWER PLANTS. I. CAROTENOID AND CLOROPHYLL PIGMENTS IN *CYMBELLA CYMBIFORMIS* KÜTZ

SUMMARY

Amongst the carotenoid pigments β-caroten, lutein and fucoxanthin were found, this last one being the principal and most characteristic pigment, and hence gifted with chemotaxonomic significance. Two secondary carotenoids not yet identified, but having similar properties to diatoxanthin and diadinoxanthin were also evidenced.

Amongst the chlorophyll pigments, clorophyll *a* and chlorophyll *c* were noticed.

The content of carotenoid and chlorophyll pigments in *Cymbella cymbiformis* varies greatly under the influence of environmental factors. Anyhow the differences thus revealed were only quantitative, not qualitative.

BIBLIOGRAFIE

1. B. C. L. Weedon, Chem. in Britain., **3**, 424 (1967).
2. S. Liaaen Jensen, Pure Appl. Chem., **14**, 227 (1967).
3. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Acad. Press, London—New York, 1965, pag. 127
4. R. Bonnett, A. K. Mallams, A. Mc. Cormick, J. L. Tee, B. C. L. Weedon, Chem. Commun., 00, 515 (1966).
5. A. K. Mallams, E. S. Waight, B. C. L. Weedon, D. J. Chapman, F. T. Haxo, T. W. Goodwin, D. M. Thomas, Chem. Commun., 00, 301 (1967).
6. B. C. L. Weedon, în Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, ed. L. Zechmeister. Vol. XXVII. Wien. Springer-Verlag, New York, 1969 pag. 81.
7. K. Aitzetmiller, W. A. Svec, J. Y. Katz, H. H. Strain, Chem. Commun., 00, 32 (1968).
8. O. Isler, *Carotenoids*, Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart 1971 pag. 43.
9. B. C. L. Weedon, Pure Appl. Chem, **20**, 55 (1970).
10. T. W. Goodwin, *The carotenoids*, citat din *Comparative Phytochemistry* (T. Swain), Acad. Press, London and New York, 1966 pag. 121.
11. G. Neamţu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **17**, 41 (1974).
12. H. H. Strain, Biological Bull., **129**, 366 (1965).
13. M. B. Allen, L. Fries, T. W. Goodwin, D. M. Thomas, J. Gen. Microbiol., **34**, 259 (1964).
14. M. Chadefaud, *Traité de botanique. Systématique*. Tome I. *Les végétaux non vasculaires (Cryptogamie)*, Masson et C^ie^ Editeurs 1960 pag. 246, 255, 262.
15. G. Neamţu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **16**, 35 (1973).
16. E. C. Grob, R. P. Pflugshaupt, Helv. Chim. Acta, **48**, 4 (1965).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 115–118, (1975)

PROTEINELE DIN MUŞCHII SCHELETICI LA UNELE SPECII ŞI LINII DE CIPRINIDE

VALENTINA JURCĂ, CLEOPATRA MATEI

Rezumat. — Se descriu particularităţile proteinogramelor din ţesutul muscular la mai multe specii şi linii de ciprinide. Se discută comparativ gradul de eterogenitate, mobilitate electroforetică şi raporturile cantitative dintre diferite fracţiuni.

În lucrări anterioare s-a semnalat importanţa cercetării comparative a proteinelor provenind din ţesuturi ale unor specii şi linii de ciprinide, atît pentru stabilirea înrudirii sau filiaţiei acestor proteine cît şi pentru obţinerea unor indicaţii asupra diferenţierii arhitecturii edificiului proteic. În acest sens s-au precizat o serie de particularităţi ale proteinelor solubile în embriogeneză (1), ale proteinelor serice (2) şi ale hemoglobinei (3) şi anume polimorfismul, mobilitatea electroforetică şi raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de componente, la nivel intra şi interspecie.

În lucrarea de faţă se studiază comparativ gradul de eterogenitate al proteinelor din muşchii scheletici aparţinînd speciilor şi liniilor de ciprinide investigate anterior. Scopul lucrării este de a preciza aria de extindere a polimorfismului proteinelor în raport cu poziţia taxonomică a speciilor şi a liniilor din interiorul aceleiaşi specii, pe baza comparării proprietăţilor electroforetice ale proteinelor respective.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat cu muşchi scheletici dorsali proveniţi de la speciile *Aristichthys nobilis*, *Ctenopharingodon idella*, *Hypophthalmicthys molitrix*, *Cyprinus carpio* sălbatic şi de cultură din linia ucraineană, linia iugoslavă şi linia ameliorată autohtonă (F_4 cu heterozis). Condiţiile de viaţă precum şi stadiul dezvoltării peştilor au fost identice cu cele citate într-o lucrare precedentă (2).

Proteinele s-au extras din fragmente de muşchi dorsali, prelevaţi şi cîntăriţi imediat după sacrificare. În paralel s-a utilizat ţesut muscular, păstrat prin îngheţare, în pungi de polietilenă, timp de 48 ore după prelevare. Rezultatele au fost identice în ambele variante. După mărunţire, ţesutul muscular s-a omogenizat cu ajutorul unui omogenizator Potter de sticlă, în raport muşchi/extractant 1/2,5. Ca extractant s-a utilizat o soluţie formată din zaharoză 0,3 M, EDTA-Na_2 3 mM în tampon TRIS-HCl 0,04 M, pH 7,5 (4). Omogenatele obţinute la rece au fost centrifugate 25 minute la 4 000 rot/min, la +4°C, iar supernatantele respective au fost recentrifugate 40 min la 6 000 rot/min. Proteinele din extracte s-au determinat cu ajutorul metodei Lowry (5). Concentraţiile proteice au

variat între 4,1 şi 5,0 g la 100 ml, în funcţie de proveniența ţesutului muscular.

Electroforeza proteinelor s-a efectuat în gel poliacrilamidă, de concentraţia 7%, la care s-a adăugat EDTA 1% după tehnica electroforezei în strat subţire (6) modificată (7), în tampon TRIS-HCl pH 8,6 (8). Condiţiile de fracţionare electroforetică au fost următoarele: tensiunea 325 V, intensitatea 25 mA, durata 3 ore şi 30 min la +4°C. S-au aplicat 500 γ proteină. Fracţiunile proteice au fost revelate cu o soluţie de amido-schwarz 0,5% în acid acetic 5%. Decolorarea s-a făcut prin spălări succesive în acid acetic 5%.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Proteinogramele muşchiului scheletic al diferitelor specii şi linii de ciprinide sînt redate în figura 1.

Aşa după cum reiese din figură, gradul de eterogenitate al proteinelor este net diferit la liniile de *Cyprinus carpio* de cultură şi la celelalte specii de ciprinide investigate. Într-adevăr, la muşchiul de *Cyprinus carpio*, linia ameliorată autohtonă (fig. 1 N), se constată prezenţa a 14 fracţiuni, la acela al liniilor ucraineană şi iugoslavă se disting cîte 13 fracţiuni (fig. 1 U, J) pe cînd, în proteinograma muşchiului de *Ctenopharingodon idella* (fig. 1 *C*) s-au evidenţiat 10 fracţiuni, iar la *Aristichthys nobilis* şi *Hypophthalmichthys molitrix* (fig. 1 *A*, *M*) cîte 9 fracţiuni. O eterogenitate similară cu a ultimelor două specii de peşti o prezintă şi proteinele din muşchiul scheletic de *Cyprinus carpio* sălbatic (fig. 1 *S*), însă repartiţia fracţiunilor proteice este total diferită.

Repartiţia diferitelor tipuri de componente ale proteinelor din muşchiul scheletic, în funcţie de mobilitatea electroforetică, reflectă de fapt, o pronunţată diferenţiere interspecii. Sub acest aspect, fiecare specie prezintă anumite particularităţi ale modelului proteinogramei.

Proteinele din muşchiul scheletic al liniilor de *Cyprinus carpio* de cultură, deşi manifestă în general cea mai mare eterogenitate în comparaţie cu proteinele musculare ale celorlalte specii de ciprinide, şi chiar faţă de ale crapului sălbatic, se caracterizează totuşi prin acelaşi model electroforetic (fig. 1 *U*, *I*, *N*). La crapul sălbatic (fig. 1 *S*) modelul electroforetic al proteinelor este aproape identic cu al liniilor de *Cyprinus carpio* de cultură, cu excepţia unor particularităţi în privinţa mobilităţii electroforetice la nivelul fracţiunilor frontale cu migrare rapidă. Ca atare, proteinele musculare prezintă o mare uniformitate intraspecifică, în comparaţie cu proteinele serului sanguin (2).

La muşchiul liniilor de *Cyprinus carpio*, proteinele sînt etalate într-un spectru mai larg decît la celelalte specii de ciprinide. Această comparaţie are de fapt intenţia, de a sublinia paralelismul dintre comportarea electroforetică a proteinelor din muşchi şi aceea a proteinelor din serul sanguin (2) şi a hemoglobinei (3) acelorași peşti investigaţi de noi anterior. Consideraţiile de mai sus referitoare la deosebirile de mobilitate în cîmp electroforetic a proteinelor din diferite ţesuturi ilustrează că, la nivelul acestor componente, diferenţele inter- şi intraspecie sînt mai evidente decît diferenţele dintre ţesuturile aceleiaşi specii sau linii (sînge,

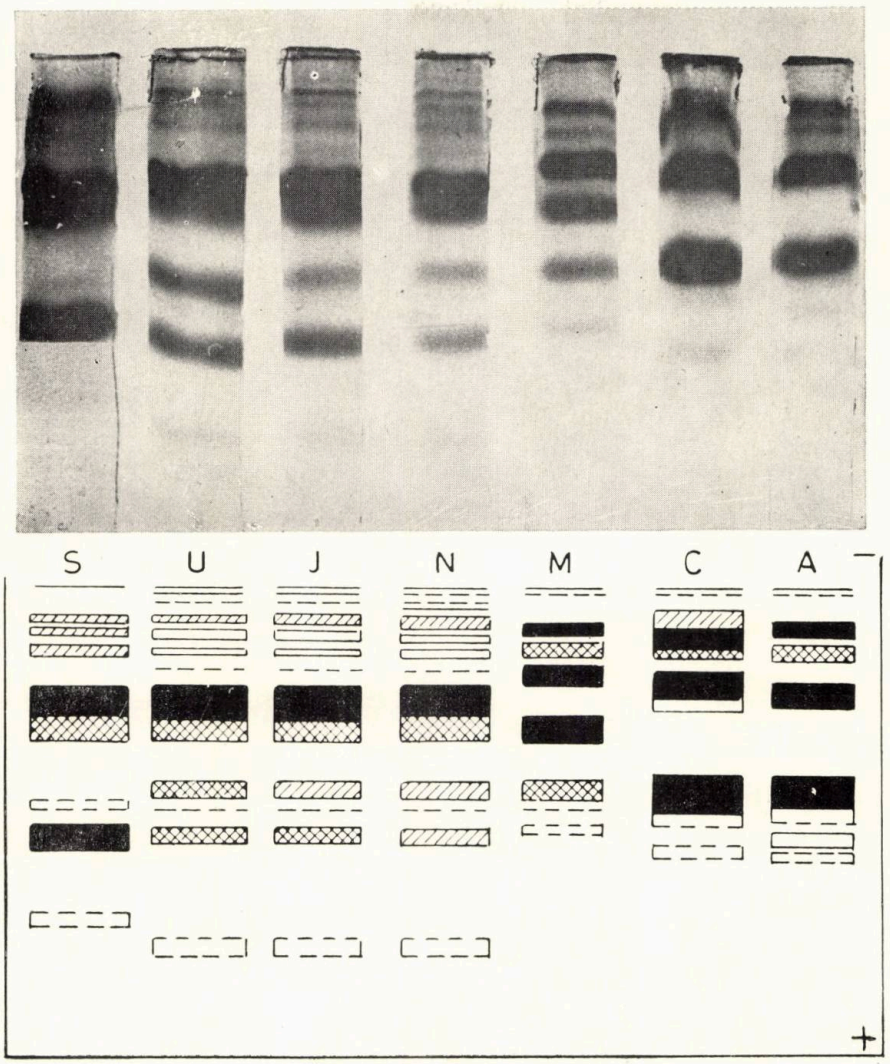


Fig. 1. Proteinogramele din mușchiul scheletic al unor specii și linii de ciprinide.
S – Cyprinus carpio sălbatic; *U* – Cyprinus carpio de cultură linia ucraineană; *I* – Cyprinus carpio de cultură linia iugoslavă; *N* – Cyprinus carpio de cultură linia ameliorată autohtonă; *M* – Hypophthalmichthys molitrix; *C* – Ctenopharingodon idella; *A* – Aristichthys nobilis.

mușchi). Această remarcă, privită într-un plan mai general, reflectă relațiile de unitate și diversitate intra- și interspecifică în contextul evoluției biochimice a speciilor și liniilor din cadrul aceleiași specii.

Ca o caracteristică generală se observă că la toate speciile investigate, inclusiv liniile din cadrul aceleiași specii, proteinele musculare sînt concentrate pe fracțiunile cu migrare intermediară. Distribuția acestora prezintă însă unele particularități în funcție de specie, ca expresie a evoluției biologice.

În sfîrșit, se constată că la linia de *Cyprinus carpio* ameliorată, autohtonă, proteinele din mușchiul scheletic manifestă un paralelism destul de marcat cu cele de la liniile ucraineană și iugoslavă (fig. 1 *N*, *U*, *I*), atît în privința mobilității electroforetice și a raporturilor cantitative dintre fracțiuni, cît și în privința gradului de eterogenitate. Constituția comună a proteinelor musculare ale liniei ameliorate autohtone și ale liniilor de *Cyprinus carpio* de cultură explică ritmul înalt de creștere a acestui pește, calitate specifică crapului de cultură. Această linie de crap a rezultat din încrucișarea de absorbție a crapului sălbatic indigen din lacul Siutghiol, cu crapul de cultură rasa Lausitz.

Pe baza rezultatelor referitoare la separarea electroforetică a proteinelor din diferite țesuturi ale acelorași specii de ciprinide se poate conchide că polimorfismul proteinelor musculare nu poate constitui un criteriu de specificitate interspecifică și, mai ales, intraspecifică, tot atît de evidentă ca în cazul proteinelor serice (2) și al hemoglobinei (3).

CONCLUZII

Proteinele din mușchii scheletici ai unor specii și linii de ciprinide prezintă anumite caracteristici interesînd gradul de eterogenitate, mobilitatea electroforetică și raporturile cantitative dintre diferite fracțiuni.

Proteinele din mușchii scheletici ai diferitelor linii de *Cyprinus carpio* prezintă un grad relativ mare de omogenitate.

Modelele proteinogramelor sugerează existența unui anumit grad de conservare a unor trăsături moleculare ale proteinelor musculare, la nivel de specie.

Prezentat la redacție la
12 februarie 1974

*Universitatea „Al. I. Cuza" și
Stațiunea experimentală piscicolă
Iași*

THE PROTEINS IN SKELETAL MUSCLES IN SOME SPECIES AND LINES OF CYPRINIDAES

SUMMARY

The proteins of skeletal muscle in some species and lines of Cyprinidaes *Ctenopharyngodon idella*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristhichtys nobilis*, the wild *Cyprinus carpio* and cultured *Ciprinus carpio* of the Yugo-

slave line, the Ukrainian line and the improved native line) were studied, distinguishing certain specific features as regards heterogeneity, electrophoretic mobility and quantitative ratios between different types of proteins. The muscle proteins present a relative great degree of intraspecific homogeneity.

BIBLIOGRAFIE

1. V. Jurcă, G. Cazacu, C. Cazacu, St. cerc. biochim., **16**, 29 (1973).
2. V. Jurcă, C. Matei, D. Matei, St. cerc. biochim., **17**, 171 (1974).
3. V. Jurcă, St. cerc. biochim., **17**, 259 (1974).
4. R. Crok, Th. Bücher, Adv. Prot. Chem., **15**, 315 (1960).
5. O. Lowry, N. J. Rosebrouch, A. Lewis-Farr, R. J. Randall J. Biol. Chem., **193**, 165 (1951).
6. L. P. Akroyd, Analyt. Biochem., **19**, 399 (1967).
7. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **13**, 313 (1968).
8. V. G. Konarev, S. L. Tiuterev, *Metodi biohimii i fitohimii nukleinovih chislot rastenii*, Edit. „Kolos" Leningrad, 1970.

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 119–122 (1975)

INTERRELAȚIILE DINTRE STRUCTURA IMUNOGLOBULINEI A DE TIP SECRETOR DE IEPURE ȘI SUSCEPTIBILITATEA ACESTEIA LA PROTEOLIZĂ

MARIANA LAKY

Rezumat. — S-a studiat susceptibilitatea imunoglobulinei A de tip secretor de iepure la acțiunea papainei. S-a evidențiat funcția protectoare a componentului secretor și rolul structurii terțiare în conferirea rezistenței la proteoliză.

Pe baza determinărilor de greutate moleculară a imunoglobinei A de tip secretor (sIgA) de iepure, Cebra și Small (1) au propus următorul model pentru structura sa cuaternară. SIgA de iepure este un dimer alcătuit din patru perechi de lanțuri polipeptidice, un component glicoproteic denumit component secretor (CS), integrat în structura dimerică prin legături de hidrogen și o piesă J care asigură structura dimerică a moleculei de sIgA prin punți disulfidice.

Din modelul prezentat, rezultă că din molecula de sIgA de iepure, CS poate fi îndepărtat în condiții în care puntea disulfidică ce asigură structura dimerică a moleculei rămîne neafectată.

Susceptibilitatea la acțiunea enzimelor proteolitice a sIgA cu și fără CS este controversată. Gheție (2,6) și Tomasi (3) la om și Steward (4) la iepure sugerează că prezența CS în molecula de sIgA îi conferă acesteia o rezistență crescută la proteoliză, în timp ce Lawton (5) la iepure nu constată vreo diferență între sIgA nativă și cea lipsită de CS. În experiențele pe care le prezentăm am încercat să lămurim această discordanță.

MATERIAL ȘI METODE

Purificarea sIgA de iepure din colostru s-a realizat după metoda lui Steward (4) modificată : iepurii au fost mulși manual în primele 48 ore post-partum, colostrul delipidat prin centrifugare la 20.000 g timp de o oră la 4°C, decazeinat prin precipitare cu acid acetic 1N la pH 4,5 și centrifugare la 3.000 g 15 minute la 4°C. Din supernatantul neutralizat cu NaOH 1M s-au aplicat 5 ml (200 mg proteină) pe o coloană cu Sephadex G-200, avînd dimensiunile 3/225 cm. Eluția s-a făcut cu tampon Tris-HCl 0,1M ce conține NaCl 0,2M și NaN_3 1‰, pH 8,0 cu un debit de 15 ml/oră. Probelor, cu un volum de 4,8 ml li s-a determinat concentrația proteică prin citirea extincțiilor la 280 nm.

Disocierea CS s-a realizat prin incubarea SIgA purificată cu următorii agenți disocianți ai legăturilor de hidrogen : guanidină hidroclorică (Mann) 5M, uree (UCB) 6M, sodium dodecyl-sulphate (Serva) 1%. SIgA

de iepure lipsită de CS s-a obţinut prin incubarea sIgA de iepure iniţială cu uree 10M în acid acetic 1N, urmată de gelfiltrare pe o coloană de Sephadex G200 cu dimensiunile 1,5/75 cm şi eluţie cu acid acetic 1N ce conţine uree 8M; extincţia proteică s-a citit la 280 nm.

Hidroliza sIgA în mediu de guanidină hidroclorică 2M şi 5M s-a făcut cu papaină în prezenţă de cisteină hidroclorică 0,01M şi EDTA 0,002M, folosind un raport enzimă-substrat de 1 : 100, timp de 20 ore. Aprecierea gradului de hidroliză s-a făcut după cantitatea de peptide eliberată, solubile în acid tricloracetic (TCA) 15%. Peste 0,2 ml hidrolizat s-au adăugat 0,6 ml TCA 20%. S-a lăsat 24 ore la temperatura camerei, s-a centrifugat la 3000 g 10 min. şi s-a citit extincţia supernatantului la 280 nm.

Martorii folosiţi pentru aprecierea hidrolizei sIgA de iepure au fost albumina serică bovină şi IgA seric dimer uman obţinut de la un pacient cu mielom (din lipsă de IgA seric de iepure la care nu se întîlneşte mielom de tip IgA).

Antiseruri folosite: ser de capră anti-colostru iepure, ser de şobolan anti-colostru iepure care evidenţiază şi CS de iepure, ser de porc anti-sIgA iepure.

Electroforeza şi imunoelectroforeza s-au făcut după micrometoda lui Scheidegger (7) folosind un gel de agaroză 1% în tampon veronal sodic pH 8,6 $\mu = 0{,}016$ în plăci şi $\mu = 0{,}05$ în cuvă, timp de 3 ore la 1 mA/cm şi 8 V/cm.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin gelfiltrarea pe Sephadex G-200 a colostrului delipidat şi decazeinat s-au obţinut trei piscuri a căror analiză electroforetică şi imunoelectroforetică a evidenţiat în primul pisc prezenţa sIgA, în al doilea a IgG şi în al treilea a lactalbuminei. Aspectul electroforetic şi imunoelectroforetic al primului pisc (bandă unică, omogenă) atestă puritatea materialului.

Prin incubarea sIgA de iepure cu diferiţi agenţi disocianţi ai legăturilor de hidrogen şi analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă 6% s-a evidenţiat desprinderea unor fragmente cu o mobilitate anodică mai mare decît a sIgA iniţială (fig. 1).

Gelfiltrarea sIgA de iepure incubată cu uree 10M timp de 4 ore la temperatura camerei, pe o coloană de Sephadex G-200 echilibrată cu acid acetic 1N ce conţine uree 8M a permis desprinderea parţială a CS de pe molecula de sIgA şi obţinerea unui procent de sIgA lipsit de CS (fig. 2).

Porţiunea I a primului pisc conţine sIgA nedisociat (2a) iar porţiunea a II-a a primului pisc conţine sIgA fără CS (fig. 2b). În piscul al doilea s-a identificat prezenţa CS.

Compararea susceptibilităţii la hidroliză cu papaină a sIgA cu şi fără CS în mediu de guanidină hidroclorică de diferite concentraţii (2 şi 5 M) este prezentată în figura 3.

Din figură reiese că acţiunea proteolitică a papainei este posibilă într-un mediu de guanidină, spre deosebire de tripsină a cărei acţiune este inhibată de prezenţa guanidinei hidroclorice în mediul de reacţie (8).

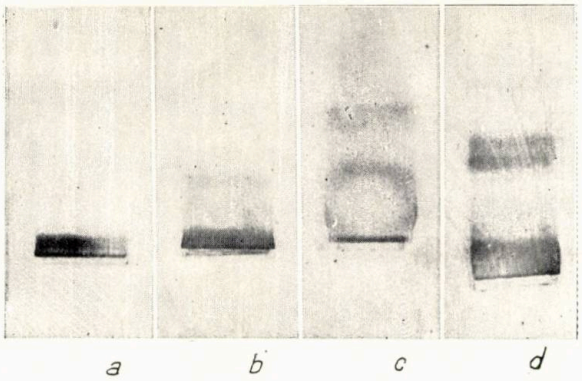


Fig. 1. Imagini electroforetice în poliacrilamidă 6% ale sIgA de iepure incubată cu agenți disocianți ai legăturilor de hidrogen. *a*) sIgA inițial, martor; *b*) sIgA incubat cu guanidină hidroclorică *c*) sIgA incubat cu uree; *d*) sIgA incubat cu SDS 1%.

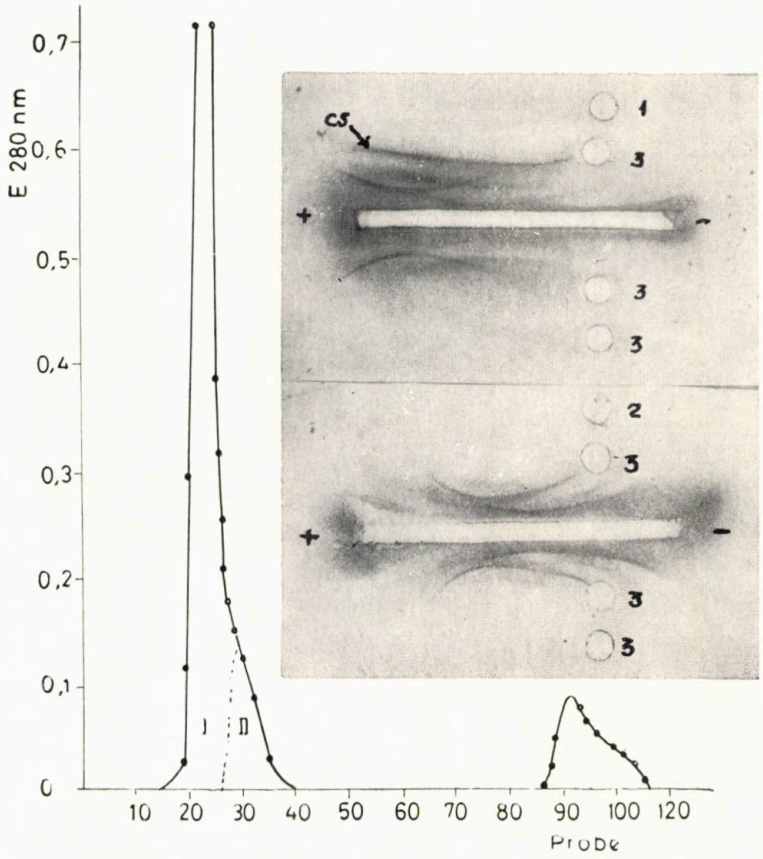


Fig. 2. Gelfiltrarea pe Sephadex G-200 a sIgA de iepure incubată cu uree 10 M. Eluție cu uree 8 M în acid acetic 1 N. Coloană 1,5/75 cm, debit 12 ml/h, probe de 2 ml. Analiza imunoelectroforetică diferențială față de ser normal de iepure a piscului 1 partea I (2a) și a piscului 1 partea II (2b) cu ser de șobolan anti-colostru de iepure pentru evidențierea CS. 1 — pisc 1 partea I, 2 — pisc 1 partea II, 3 — ser normal de iepure, CS — component secretor.

În cursul hidrolizei albuminei serice bovine (fig. 3e) folosite ca martor peptidele s-au eliberat independent de concentrația guanidinei hidroclorice; ușoara scădere a cantității de peptide eliberate poate fi pusă pe seama unei inhibări a enzimei de către guanidina hidroclorică.

Creșterea susceptibilității sIgA în funcție de concentrația guanidinei hidroclorice (fig. 3a) arată că disocierea CS de sIgA dimer descoperă în molecula dimerului zone interdomenii minibalama, apte de a fi atacate de papainã. Aceste date dovedesc că prezența în mediu a CS nu conferă rezistența moleculei, fiind exclusă posibilitatea sugerată de Shim (9) că activitatea enzimatică este blocată de CS.

SIgA incubată cu guanidină hidroclorică 2 și 5M timp de 4 ore la temperatura camerei a fost dializată 48 ore față de tampon fosfat 0,1M pH 7,0 pentru îndepărtarea guanidinei și recombinarea CS cu dimerul de IgA. S-a determinat susceptibilitatea la acțiunea papainei a sIgA recombinat și s-a constatat refacerea rezistenței la proteoliză (fig. 3b).

IgA dimer seric uman, folosit ca martor, a fost hidrolizat în prezența guanidinei hidroclorice 2 și 5M (fig. 3c). De asemenea a fost hidrolizat IgA dimer seric uman incubat 4 ore cu guanidină hidroclorică 2 și 5M care apoi a fost îndepărtată prin dializă (fig. 3d). Faptul că în prezența guanidinei hidroclorice are loc o creștere a susceptibilității la proteoliză a IgA seric dimer sugerează că agentul care disociază CS influențează structura dimerică și conformația terțiară a moleculei de IgA, producînd o depliere a lanțurilor polipeptidice și prin urmare expunerea unor noi legături peptidice la atacul papainei. Reiese deci că creșterea susceptibilității sIgA de iepure în condițiile guanidinei hidroclorice nu poate fi pusă numai pe seama disocierii CS ci și pe seama modificării structurii terțiare a moleculei, puternic afectată de deplierea catenelor polipeptidice. Această observație este întărită de faptul că sIgA lipsit de CS obținut prin gelfiltrare pe Sephadex G-200 a sIgA incubat cu uree 10M (fig. 2, pisc 1, partea II) este numai cu 30% mai susceptibil decît sIgA cu CS legat (fig. 2, pisc 1, partea I). SIgA incubat cu uree cu CS

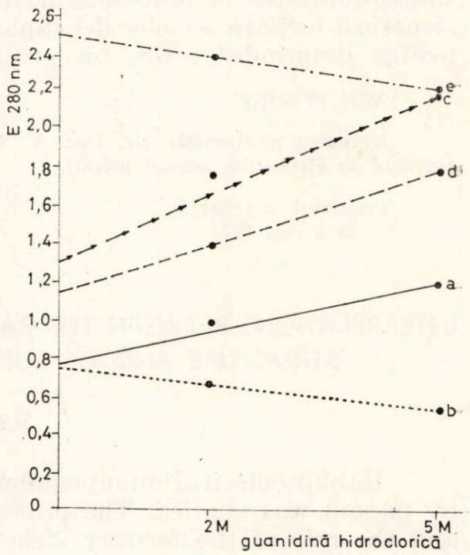


Fig. 3. Susceptibilitatea la hidroliză cu papainã a sIgA de iepure în prezența unor concentrații crescînde de guanidină hidroclorică.
a) SIgA de iepure hidrolizat în prezență de guanidină hidroclorică (cu CS disociat); b) SIgA de iepure incubat cu guanidină hidroclorică, care apoi a fost îndepărtată prin dializă (cu CS recombinat); *c*) IgA dimer uman seric hidrolizat în prezența guanidinei hidroclorice; *d*) IgA dimer uman seric incubat cu guanidină hidroclorică care apoi a fost îndepărtată prin dializă; *e*) Albumină serică bovină hidrolizată în prezență de guanidină hidroclorică.

legat (fig. 2, pisc 1, partea I) este cu 23,7% mai susceptibil decît sIgA inițial, netratat cu uree. SIgA inițial este cu 40% mai rezistent la tratamentul enzimatic decît IgA mielom.

În concluzie, datele noastre sînt în acord cu Stewart (4) că pentru molecula sIgA de iepure CS are o importantă funcție protectoare, dar susceptibilitatea la proteoliză datorată modificărilor conformaționale ale structurii terțiare a moleculei supusă tratamentului cu un agent disociant pentru desprinderea CS, nu poate fi neglijată.

MULȚUMIRI

Autoarea mulțumește Dr. Doc. V. Gheție pentru prețioasele sugestii și îndrumarea acordată în efectuarea acestei lucrări.

Prezentat la redacție
la 2 mai 1974

Institutul „V. Babeș"
București

INTERRELATIONS BETWEEN THE RABBIT SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A STRUCTURE AND ITS SUSCEPTIBILITY TO PROTEOLYSIS

SUMMARY

Rabbit colostral immunoglobulin A(sIgA) susceptibility to proteolysis by papain was studied. The protective function of secretory component and the role of the tertiary structure of rabbit sIgA molecule and the resistance to proteolysis are discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. J. J. Cebra, P. A. Small, Jr., Biochemistry, **6**, 503 (1967).
2. V. Gheție, G. Moța, Immunochemistry, **10**, 839 (1973).
3. T. B. Thomasi Jr., *The Secretory Immunologic System*, ed. Dayton, D. H. Jr., Small, P. A. Jr., Chanock, R. M., Kaufman H. E., Thomasi T. B. Jr., Md. U.S. Government Printing Office, Washington DC, 1971, p. 71.
4. M. Steward, Biochim. Biophys. Acta, **236**, 440 (1971).
5. A. R. Lawton, *The Secretory Immunologic System*, ed. Dayton, D. H. Jr., Small, P. A. Jr., Chanock, R. M. Kaufman H. E., Thomasi T. B. Jr., Md. US Government Printing Office, Washington DC, 1971, p. 55.
6. V. Gheție, N. St. Chișiu, S. Mihăescu, St. cerc. biochim., **14**, 371 (1971).
7. J. J. Scheidegger, Internat. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
8. M. Laky, *Joint Meeting of European Societies for Immunology*, Strasbourg, 4—7 September 1973, Abstracts, p. 44.
9. B. S. Shim, Y. S. Kang, W. J. Kim, S. H. Cho, D. B. Lee, Nature, **22**, 787 (1969).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 123–128 (1975)

HIDROLIZA TRIPTICĂ A IgA UMANE SECRETOARE

GABRIELA MOȚA

Rezumat. — Imunoglobulina A secretoare umană supusă tripsinolizei, în condiții variate de temperatură și timp, a fost hidrolizată în peptide în proporții de 50 %. O fracțiune rezistentă la tripsină s-a pus în evidență, ea nu a fost hidrolizată chiar dacă la digeratul de proteină s-a adăugat o nouă cantitate de tripsină. Nu s-au pus în evidență diferențe în procentul de sIgA hidrolizată cu tripsină prin incubare inițială sau fără incubare a proteinei la 60°C timp de 3 ore.
Aceste rezultate sugerează că esxistă două populații de molecule de IgA secretoare umană : una susceptibilă la atacul cu tripsină, și a doua rezistentă.
Nu s-au făcut investigații a populației de molecule de s IgA rezistentă din punctul de vedere al determinantului antigenic de subclasă.

Studiile efectuate pînă în prezent asupra susceptibilității la hidroliza enzimatică a IgA au arătat că IgA secretoare (sIgA) este mai rezistentă la hidroliza enzimatică decît IgA serică (1—3). Rezistența la hidroliza enzimatocă a sIgA, a fost studiată de Lawton (4), Stewart (5), Shuster (2), Gheție (3) ; dar rezultatele obținute nu au putut să aducă precizarea dacă rezistența conferită se datorește CS conținut în moleculă sau structurii dimerice a sIgA ; rolul de protecție pe care CS îl conferă moleculei de sIgA a fost demonstrat de Gheție și Moța (6) și Lindh (7).

Zikan și col (8) au efectuat studii de hidroliză cu tripsină a sIgA umane și au analizat fracțiunile obținute, dar nu au determinat condițiile în care se distruge cantitatea maximă de proteină.

Scopul lucrării de față a fost acela de a găsi condițiile în care se obține hidroliza maximă cu tripsină a sIgA umane și procentul de imunoglobină distrusă în aceste condiții.

MATERIAL ȘI METODE

Purificarea sIgA din colostru uman s-a făcut printr-o singură gel-filtrate pe Sephadex G-200, pe o coloană de 240/4 cm, cu condiția ca proteina introdusă să nu depășească 180 mg. Puritatea sIgA s-a testat prin probe de dublă difuzie Ouchterlony, imunoelectroforeză, electroforeză în agaroză 1% și poliacrilamidă 6%.

Hidroliza sIgA s-a făcut în TRIS-HCl 0,2M + $CaCl_2$ 0,02 M pH 8, la o concentrație a proteinei de 10 mg/ml. Raportul tripsină proteină = 1/50 ; tripsina s-a solubilizat în HCl 0,001 N și s-a adăugat într-un volum ce nu depășește 5% din volumul soluției de proteină. Pentru a urmări mersul hidrolizei sIgA în funcție de timp, probele s-au scos din hidrolizat la intervale diferite de timp și s-au adăugat peste o soluție TCA 6% în proporție de 1/5 ; după o ședere de 30 min la temperatura

camerei, urmată de centrifugare, s-au citit extincțiile supernatantelor la 280 nm. Controlul s-a făcut prin solubilizarea sedimentului în NaOH în volum egal cu proba inițială și citirea la spectrofotometru.

Proba martor s-a luat în primele 10 s după adăugarea tripsinei sub agitare, extincția ei s-a scăzut din extincțiile celorlalte probe. Incubarea probelor s-a făcut la temperaturi ce variază între 37—63°C și timp între 30—48 h; la probele peste 24 h s-a mai adăugat odată aceeași cantitate de tripsină. Pentru a evita influența produșilor de hidroliză de greutate moleculară sub 10 000, care nu precipită cu TCA și a unei eventuale modificări de pH, s-a efectuat în paralel hidroliza la dializă, rezultatele au fost similare.

Influența temperaturii asupra moleculei de sIgA s-a testat prin încălzirea în trepte a unei soluții de proteină și menținerea ei la temperaturi cuprinse între 57—70°C. O ușoară opalescență a apărut la 61,2°C și 65,5°C. Prin centrifugarea probelor incubate sub 63°C nu a avut loc depunere de proteină. La proba incubată la 70°C, prin centrifugare și citirea supernatantului la 280 nm, s-a constatat că sIgA solubilă a rămas în proporție de 15,6%, iar prin resolubilizarea sedimentului și centrifugare, în supernatant s-a mai redizolvat 3,4% proteină cu grad mai mic de alterare; proteina alterată a fost în proporție de 81,8%. Astfel hidrolizele s-au efectuat la temperaturi sub 63°C, cu controlul imunoelectroforetic al hidrolizatului la 24 h.

Martorul pentru testarea influenței temperaturii asupra moleculei de sIgA, în sensul modificării susceptibilității sale la hidroliză, s-a făcut prin incubarea proteinei timp de 3 h la 60°C, care proteină a fost supusă apoi hidrolizei cu tripsină la 37°C (ținînd seama de faptul că hidroliza maximă a fost obținută la 59,5—60°C și considerînd temperatura de 63°C drept limită.

REZULTATE

Comparînd hidroliza la 37°C a unei sIgA umane nesupusă unui tratament termic inițial, cu cea a unei sIgA incubate în prealabil 3 h la 60°C, în lucrarea de față s-a constatat că în primul caz s-au obținut numai în 3 h valorile care la proteina neincubată s-au obținut în 6 h, dar cantitatea de material hidrolizat final a fost constantă (fig. 1). În schimb, prin hidroliza efectuată la 60°C procentul de sIgA distrusă s-a dublat (fig. 2).

Luînd în considerare factorul timp, s-a constatat că valorile maxime înregistrate s-au obținut la 22 h, după care s-a stabilizat cu variații neînsemnate pînă la 48 h. Prin readăugarea de enzime la 24 h a avut loc în continuare o creștere de 3 ori mai mică a valorilor hidrolizei, raportate la primele 24 h, ca și cum materialul rămas nehidrolizat ar fi mai rezistent la hidroliza enzimatică.

Luînd în considerare factorul temperatură, s-a constatat că între 37—50°C hidroliza a înregistrat valori foarte apropiate, ca și între 59—63°C, însă între 50—59°C a apărut o creștere importantă a valorilor hidrolizei.

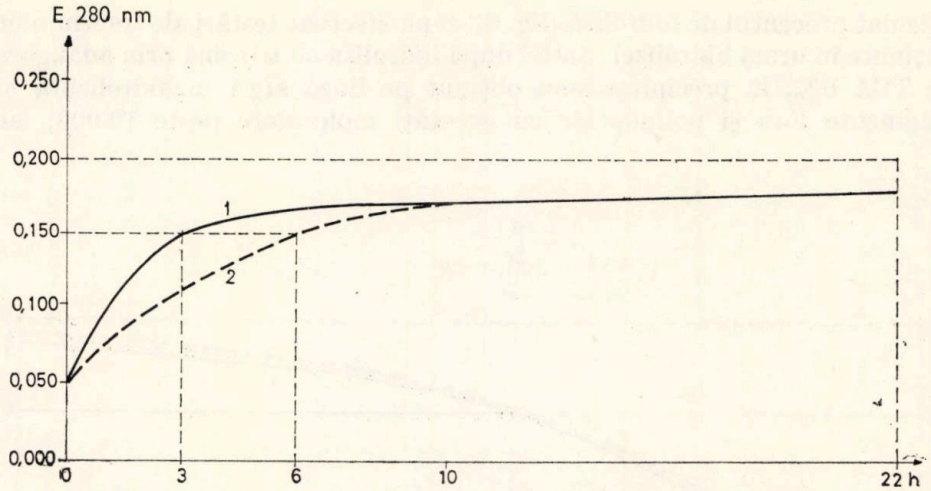


Fig. 1. Hidroliza cu tripsină a sIgA umane incubată (*1*) şi neincubată (*2*) în prealabil la 60°C.

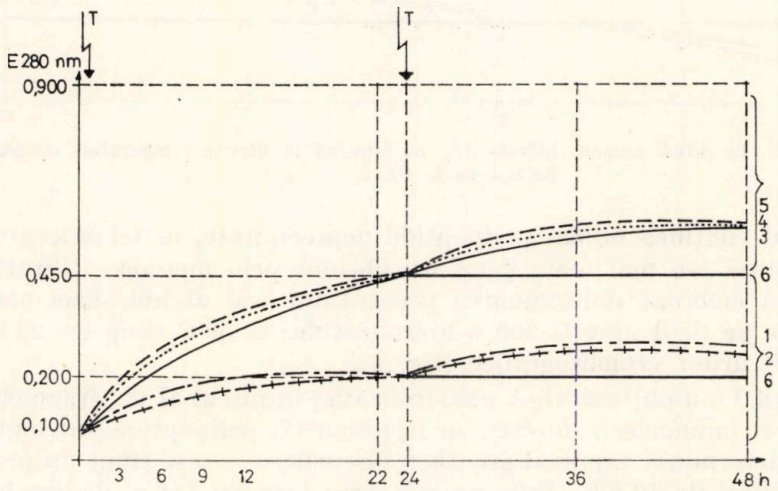


Fig. 2. Hidroliza cu tripsină a sIgA umane, la diferite temperaturi: 37° (*1*), 50° (*2*), 59° (*3*), 60° (*4*), 63° (*5*). Săgeata (*T*) arată momentul adăugării tripsinei. (*6*) curba fără adaus de tripsină după 24 ore.

Graficul extincţiilor sedimentului solubilizat în NaOH 1N a prezentat o curbă descendentă. Făcînd diferenţa între extincţia martorului (la T_0) şi extincţia minimă (la 22 h), s-a obţinut o extincţie ce reprezintă cantitatea de proteină hidrolizată. Efectuînd o operaţie similară, prin scăderea probei martor de data aceasta, din extincţia maximă (la 22 h) la probele supernatantului, s-a obţinut o extincţie ce s-a suprapus peste cea obţinută din sediment, cele două metode confirmîndu-se reciproc, şi care reprezintă cantitatea de proteină hidrolizată.

Cunoscînd concentraţia iniţială a sIgA (10 mg/ml) şi volumele adăugate peste TCA, s-a determinat cantitatea de proteină corespunzătoare fiecărei probe; cunoscînd şi cantitatea de proteină hidrolizată, s-a

calculat procentul de hidroliză (fig. 3). S-au efectuat testări ale fracțiunilor obținute în urma hidrolizei. Astfel după hidroliza cu tripsină prin adăugare de TCA 6%, în precipitat s-au obținut pe lîngă sIgA nehidrolizată și fragmente Fab și polipeptide cu greutăți moleculare peste 10 000, iar

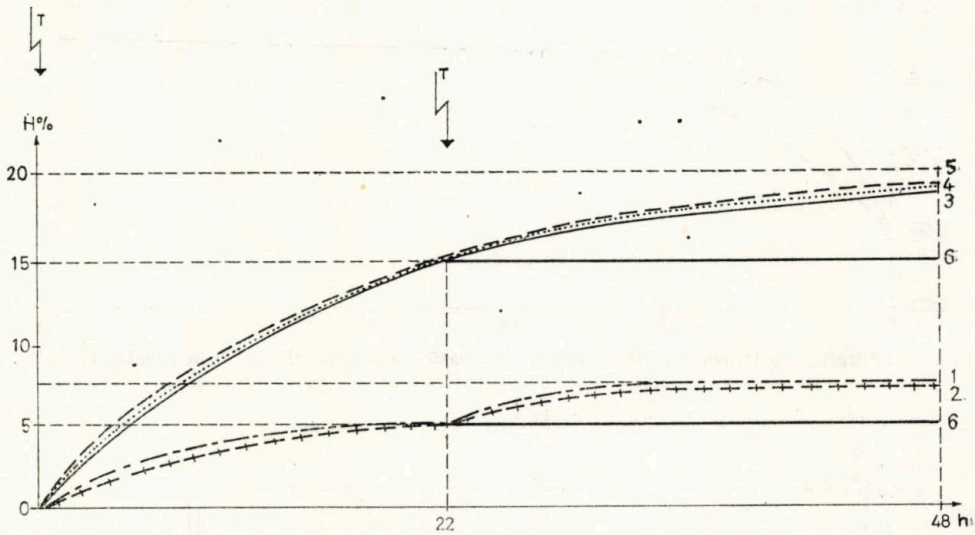


Fig. 3. Procentul de sIgA umană hidrolizată, cu tripsină la diferite temperaturi. Aceleași notații ca la fig. 2.

supernatantul conținea numai polipeptide neprecipitate, astfel procentul real al hidrolizei era mai mare decît cel obținut prin metoda utilizată. De aceea, s-a efectuat determinarea procentului real al hidrolizei prin cromatografie pe Sephadex G-200 a hidrolizatului la 59°C timp de 22 h, și analiza piscurilor cromatografice (fig. 4).

În piscul 1 s-a obținut sIgA nehidrolizată; în piscul II un fragment Fab identificat imunoelectroforetic, iar în piscul III polipeptide provenite din Fc. S-a determinat raportul greutății piscurilor și s-a obținut un procent al hidrolizei de 49,8%. Prin concentrarea piscului III și dializa lui față de o soluție NaCl 0,0145M timp de 72 h, s-au eliminat polipeptidele cu greutate moleculară $< 10\,000$. Efectuînd analiza cantitativă înainte și după dializă, s-a calculat procentul de polipeptide dializate de 28%.

Pentru compararea metodei cromatografice cu metoda precipitării cu TCA, s-a determinat greutatea în mg corespunzătoare procentului de polipeptide dializabile. Apoi, s-a calculat cît la sută din hidroliză reprezintă greutatea corespunzătoare polipeptidelor dializabile și cunoscînd că hidroliza atinge valoarea de 49,8%, s-a calculat cîte procente din aceasta sînt reprezentate de polipeptidele dializabile. S-au găsit 12% procente. Rezultatul a fost comparabil cu cel obținut prin metoda precipitării cu TCA, 14%.

Zikan și col. (8) au efectuat studii de hidroliză cu tripsină a sIgA umane, utilizînd timpi ce variau între 10—30 min, la temperaturi între

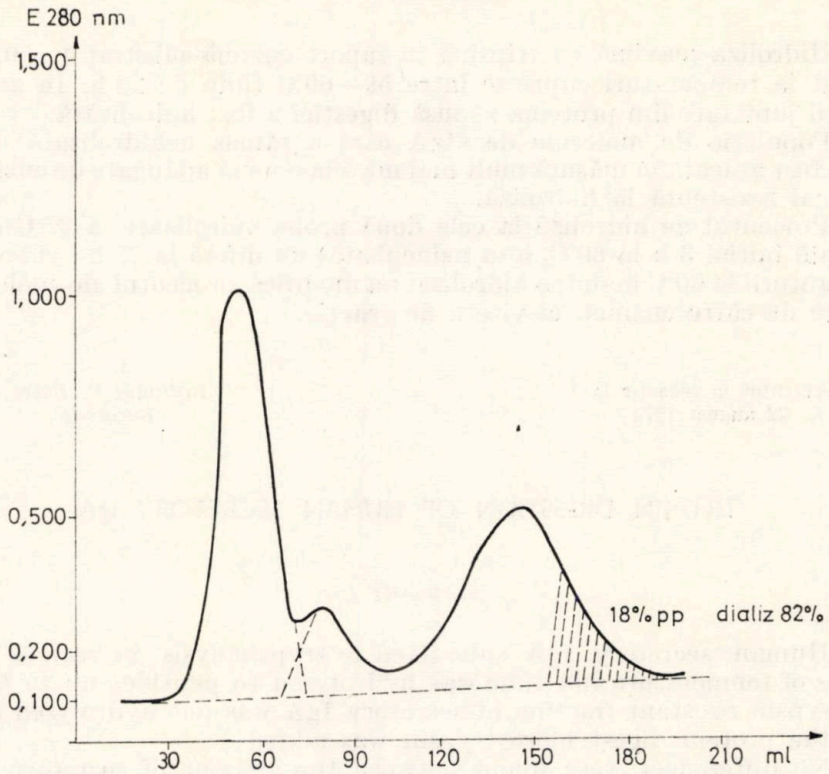


Fig. 4. Gel-filtrarea pe Sephadex G-200 (coloană 120 × 2,5 cm) a sIgA umane hidrolizată cu tripsină la 59°C, 22 ore.

50—65°C, şi o hidroliză de 6 ore la 37°C. Ei au studiat fragmentele rezultate din hidroliză, identificînd un fragment Fab, F $(ab')_2$ şi Fc parţial digerat.

Brown şi col. (1) pun problema posibilităţii ca subclasa IgA2, care constituie o componentă a IgA din secreţii, să fie mai rezistentă la hidroliza enzimatică; ei menţionează că diferenţa moderată în concentraţia subclaselor nu poate să fie cauza diferenţei mari în susceptibilitate la hidroliza enzimatică a sIgA faţă de IgA serică.

Schuster (2) au studiat comparativ hidroliza cu papaină a sIgA şi IgA de mielom din subclasa alpha-1 şi alpha-2 şi au constatat că sIgA a fost cea mai rezistentă; subclasa alpha-1 aparţinea populaţiilor rezistente, în timp ce subclasa alpha-2 a fost de 3—4 ori mai sensibilă la hidroliza enzimatică.

Rezultatele obţinute în această lucrare au pus în evidenţă existenţa unei populaţii de molecule de sIgA umană, rezistenţă la hidroliza cu tripsină, care a rămas neatacată la o a doua adăugare de enzimă, cît şi prin ridicarea iniţială a temperaturii soluţiei de sIgA la 60°C. În acord cu aceste date experimentale apare ca posibilă o hidroliză preferenţială a unei subclase.

CONCLUZII

Hidroliza maximă cu tripsină în raport enzimă-substrat 1 : 50, s-a obținut la temperaturi cuprinse între 59—60°C timp de 22 h. În aceste condiții jumătate din proteina supusă digestiei a fost hidrolizată.

Populația de molecule de sIgA care a rămas nehidrolizată după 22 h a fost atacată în măsură mult mai mică la o nouă adăugare de enzimă, deci mai rezistentă la hidroliză.

Procentul de hidroliză la cele două probe hidrolizate la 37°C (una incubată inițial 3 h la 60°C, alta neincubată) nu diferă la 22 h ; ridicarea temperaturii la 60°C înaintea hidrolizei nu modifică procentul de molecule atacate de către enzimă, ci viteza de reacție.

Prezentat la redacție la
22 august 1974

Institutul V. Babeș
București

TRYPSIN DIGESTION OF HUMAN SECRETORY IgA

SUMMARY

Human secretory IgA submitted to trypsinolysis in various conditions of temperature and time was hydrolysed to peptides up to 50%. The trypsin resistant fraction of secretory IgA was not hydrolysed even if to the protein digest more trypsin was added.

No differences were found between the amount of secretory IgA hydrolysed by trypsin with or without prior incubation of IgA at 60°C for 3 hours.

These results suggest that there are two populations of human secretory IgA molecules : one susceptible to be attacked by trypsin and the second resistant to trypsin digestion even if an additional amount of trypsin was added or the protein was heat-sensitized before hydrolysis.

No attempts were made to identify the trypsin resistant and sensitive human secretory IgA fraction with the well-known IgA and IgA2 subclasses.

BIBLIOGRAFIE

1. W. R. Brown, K. Newcombe, K. Ishizaka, J. Clin. Invest., **49**, 1374 (1970).
2. J. Shuster, Immunochemistry, **8**, 405 (1971).
3. V. Gheție, N. St. Chișiu, S. Mihăescu, St. cerc. Biochim., **14**, 371 (1971).
4. A. R. Lawton, *The secretory Immunological Systems* (ed. Dayton D. H. Jr., Small P. A. Jr., Chanock R. M., Kaufman H. E., Tomasi T. B. Jr.), Md. US Government Printing Office, Washington DC, 1971, p. 55.
5. M. W. Steward, Biochim. Biophys. Acta, **236**, 440 (1971).
6. V. Gheție, G. Moța, Immunochemistry, **10**, 839 (1973).
7. E. Lindh, J. Immunol., **114**, 284 (1975).
8. J. Zikan, R. E. Mestecky, M. Schrohenloher, M. Tomana, R. Kulhavy, Immunochemistry 9, 1189 (1972).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 129–134, 1975

CONȚINUTUL ÎN GLUCIDE AL MIERII DE MANĂ ȘI FLORALE DE DIFERITE PROVENIENȚE, CA URMARE A RELAȚIILOR TROFICE DINTRE LACHNIDAE-FORMICIDAE-APINAE

DINU PARASCHIVESCU și ILEANA HURGHIȘIU

Rezumat. — S-au efectuat cercetări comparative asupra glucidelor componente ale mierei florale și de mană, ca urmare a relațiilor trofice dintre Lachnidae- Formicidae-Apinae. S-au constatat diferențe evidente între diferitele proveniențe de miere colectate din zone variate, în funcție de specia gazdă precum și de perioada de colectare.

În ultimul timp, mierea de mană este mult apreciată, datorită proprietăților sale fizico-chimice (culoare, concentrație în glucide, componența glucidelor, conținutul în vitamine, hormoni etc.) superioare celor ale mierei florale. Această miere de mană reprezintă rezultatul unor relații trofice complexe care se stabilesc între Lachnidae — (păduchi de plante) — Formicidae (furnici) — Apinae (albine). Coloniile de lachnide se dezvoltă pe plante în bune condiții numai cînd sînt favorizate de protecția formicidelor. Mana de pădure (excrementele lachnidelor) constituie materia primă necesară albinelor la producerea mierei de mană. Se cunosc pînă în prezent diferite specii de Formicidae, care sînt valoroase în relațiile trofice mai sus amintite.

Cercetări asupra caracteristicilor fizico-chimice ale mierei florale, în comparație cu cea de mană, au efectuat Kloft, Maurizio și Kaeser (4) și Cîrnu (2), care au constatat prezența unor grupe glucidice asemănătoare în mierea de mană precum și în cea florală.

Avînd în vedere cele arătate mai sus, ne-am propus să efectuăm cercetări comparative asupra conținutului în glucide din mierea de mană, comparativ cu cea florală, din diferite zone ale R.S. România, referindu-ne în special asupra influenței relațiilor trofice care se stabilesc între Lachnidae-Formicidae-Apinae în producerea mierei de mană în funcție de zona forestieră în care se practică apicultura (diferite specii lemnoase) precum și efectuarea unor determinări cantitative ale proporției de miere de mană prezentă în diferite proveniențe de miere colectate din unele zone.

MATERIAL ȘI METODĂ

Probele de miere de mană și florală (martor) s-au colectat din diferite regiuni în cursul anului 1973 și anume : probe de miere de mană din localitățile Rebrișoara (Pîrîul negru), Valea mare (șanț), Lunca Ilvei (Cucureasa), toate din jud. Bistrița Năsăud, apoi Vatra Dornei (jud. Suceava) și Dragu (jud. Sălaj), iar probele de miere florală din localitățile Dragu (jud. Sălaj), Valea lui Mihai (jud. Satu Mare), și Ciucurova (jud. Tulcea).

Tabela 1

Speciile de formicide și lahnide identificate în zonele investigate și proporția în miere de mană din probe de miere de diferite proveniențe (%).

Nr. crt.	Locul de colectare	Data colectării	Speciile de formicide	Speciile de lahnide	Zona forestieră unde se practică apicultura	Tipul de miere	Proporția mierei de mană în mierea examinată %
1	Rebrișoara 1600 m, Bistrița Năsăud	iulie august	Formica polyctena Formica rufa Formica pratensis	Buchneria pectinatae	brad	mană	10
2	Valea Mare (Rodna veche) 900 m, Bistrița-Năsăud	iulie	Formica rufa Formica polyctena Formica pratensis	Cinara picea	molid	mană	20
3	Vatra Dornei 1200 m Suceava	iulie	Formica polyctena Formica rufa Formica pratensis	Buchneria pectinatae	brad	mană	5
4	Lunca Ilvei Cucureasa 700 m Bistrița-Năsăud	iulie	Formica rufa Formica pratensis Formica polyctena	Buchneria pectinatae Cinara picea	brad molid	mană	10
5	Dragu Sălaj, 400 m	iunie	Formica rufa Formica pratensis	Lachnus roboris	stejar	mană	30
6	Dragu Sălaj 400 m	august	Formica polyctena Formica pratensis Formica rufa	Lachnus roboris	stejar	mană	55
7	Dragu Sălaj 400 m	mai iunie	Formica polyctena Formica pratensis Formica rufa	Aphis sp.	salcîm	florală	5
8	Valea lui Mihai Satu Mare 200 m	mai	Formica pratensis	Aphis sp.	salcîm	florală	8
9	Ciucurova Tulcea 100m	iulie	Formica pratensis	Eucalipterus tiliae	tei	florală	40

Pentru identificarea precisă a mierei de mană, precum şi a procentului de miere de mană existent în diferite probe de miere, s-a utilizat metoda de precipitare cu alcool. Aceasta constă în diluarea probelor de miere în părţi egale (1 : 1) cu apă distilată. Urmează precipitarea cu alcool etilic 96% (1 : 10). Dacă proba conţine miere de mană, soluţia se tulbură, apare un precipitat evident, care ulterior se depune pe fundul eprubetelor. Cu cît proporţia de miere de mană este mai mare, cu atît stratul de precipitat depus pe fundul eprubetei este mai gros, respectiv turbiditatea suspensiei mai densă. Determinarea proporţiei de miere de mană existentă în diferite probe de miere s-a făcut pe baza cunoaşterii cantităţii de miere introdusă iniţial în probă şi prin determinarea precipitatului obţinut, care reprezintă conţinutul în miere de mană al probei respective prin metoda turbidimetrică (măsurarea fotometrică a turbidităţii suspensiei cu ajutorul unei curbe de etalonare).

În vederea separării glucidelor prezente în mierea de mană, comparativ cu cea floral ă, ca urmare a relaţiilor trofice ce se stabilesc între Lachnidae - Formicidae - Apinae, s-a utilizat metoda cromatografiei pe hîrtie (3). Probele de miere, diluate 1 : 10 cu apă distilată, s-au aplicat în cantitate de 0,03—0,04 ml pe hîrtia cromatografică MN 263. Migrarea cromatogramelor s-a făcut ascendent, în solventul butanol-acid acetic-apă (4 : 1 : 5), timp de 96 ore. Colorarea acestora s-a obţinut prin pulverizare cu p- aminofenol 1% în alcool etilic. Coloraţia apare prin uscare în etuvă la 80°C. În prealabil s-a stabilit R_F-ul fiecărei componente glucidice în sistemul de developare butanol-acid acetic-apă (4 : 1 : 5), utilizînd ca martor de referinţă substanţe etalon pure (Merck).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute sînt prezentate în tabelele 1—3.

Tabela 1 cuprinde date asupra speciilor de lachnide şi formicide valoroase în relaţiile trofice cu apinele. De asemenea arată proporţia în miere de mană, exprimată procentual (%) a diferitelor sorturi de miere colectate în cursul anului 1973. Din acest tabel se constată că probele de miere de diferite provenienţe prezintă variaţii ale proporţiei în miere de mană cuprinse între 5—55%.

În probele de miere floral ă (martor) se constată variaţii ale concentraţiei în mană cuprinse între 5—8% cu o singură excepţie, a probelor de miere colectate din Delta Dunării unde s-a găsit o concentraţie medie de 40%, ceea ce reprezintă un rezultat al prezenţei coloniilor de Aphidae.

În tabela 2, se prezintă R_F-ul fiecărei componente glucidice utilizînd ca martori de referinţă substanţe etalon, la diferite nivele ale frontului de migrare a solventului. Ordinea migrării de sus în jos este: xiloză-arabinoză, fructoză-sorboză, galactoză-glucoză, zaharoză, lactoză şi melicitoză.

Tabela 3 prezintă rezultate asupra componentelor glucidice prezente în probele de miere de mană şi în cea floral ă. Se constată lipsa xilozei şi arabinozei în toate probele cercetate. Fructoza-sorboza şi galactoza-glucoza sînt prezente în toate probele analizate. În schimb zaharoza, lactoza

Tabela 2

R_F-ul componentelor glucidice, determinat pe baza martorilor de referință (substanțe etalon) la diferite nivele ale frontului de migrare a solventului

Glucide componente	R_F (cm)		
	19,5 cm	22,0 cm	26,0 cm
Xiloză-Arabinoză	18,5 (1,0)	21,0 (1,0)	25,0 (1,0)
Fructoză-Sorboză	17,3 (1,1)	17,5 (1,2)	22,5 (1,1)
Galactoză-Glucoză	14,8 (1,3)	14,0 (1,5)	18,5 (1,4)
Zaharoză	10,2 (1,9)	9,5 (2,3)	12,5 (2,0)
Lactoză	6,0 (3,2)	7,5 (2,9)	8,0 (3,2)
Melicitoză	4,2 (4,8)	4,3 (5,0)	4,5 (5,7)

Tabela 3

Glucidele existente în mierea de mană comparativ cu cea florală, în cursul anului 1973

Glucide	Rebrișoara mană	Valea Mare mană	Vatra Dornei mană	Lunca Ilvei mană	Dragu mană iunie	Dragu mană august	Dragu florală	Valea lui Mihai florală	Ciucurova florală
Xiloză-Arabinoză	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Fructoză-Sorboză	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactoză-Glucoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Zaharoză	+	+	+	+	–	+	+	+	+
Lactoză	+	+	+	+	–	+	+	+	–
Melicitoză	+	+	+	+	–	+	+	+	–
Total număr de grupe glucidice	5	5	5	5	2	5	5	5	3

și melicitoza prezintă modificări în sensul că lipsesc în proba de miere de mană colectată în iulie din comuna Dragu, jud. Sălaj. De asemenea lipsesc lactoza și melicitoza în proba de miere florală colectată din Delta Dunării.

Comparînd rezultatele obținute la diferite proveniențe de miere de mană din aceeași localitate, și anume din comuna Dragu, jud. Sălaj, provenită de la una și aceeași esență lemnoasă (stejar), se constată că în luni diferite apar diferențe evidente la zaharoză, lactoză și melicitoză : în timp ce în luna iunie aceste glucide lipsesc, ele sînt prezente în luna august.

Comparînd probele de miere de mană (stejar) cu cea florală (salcîm) din aceeași localitate, comuna Dragu (jud. Sălaj), din luna iunie, se constată că există diferențe semnificative în sensul că în timp ce la mierea de mană lipsesc zaharoza, lactoza și melicitoza, acestea sînt prezente în mierea florală.

Din rezultatele obținute se constată că există diferențe evidente între diferite proveniențe de miere de mană și florală, în sensul variației componenței în glucide în funcție de anumiți factori biotici și abiotici.

Cercetările efectuate de noi aduc contribuții originale asupra existenței unei relații trofice evidente între Lachnidae - Formicidae - Apinae, care influențează asupra producerii mierei de mană în funcție de zona forestieră în care se practică apicultura (dependentă de diferite specii lemnoase din zona respectivă), de perioada de colectare a probelor și

asupra proporţiei de miere de mană prezentă în diferite provenienţe de miere ale R. S. România. Cercetările noastre arată că în cazul efectuării apiculturii în zona forestieră alcătuită din stejar s-au înregistrat în general cele mai crescute proporţii de miere de mană, urmează cele identificate în zonele de molid şi cele în asociaţie brad-molid. În general în mierea florală din zonele de salcîm proporţia de miere de mană e aproape inexistentă.

În ceea ce privesc speciile de formicide care s-au dovedit a avea un rol deosebit în relaţia trofică dintre Lachnidae-Formicidae - Apinae sînt *Formica rufa* L., *Formica pratensis* Retz. şi *Formica polyctena* Főerst., care se găsesc în asociaţie cîte două sau trei specii în aceeaşi zonă (stejar) unde s-a identificat proporţia cea mai ridicată de miere de mană, astfel *Formica rufa* L. şi *Formica pratensis* Retz. sau *Formica polyctena* Főerst., *Formica pratensis* Retz. şi *Formica rufa* L.

Grupele glucidice identificate de noi aduc precizări asupra unor diferenţe evidente găsite între mierea de mană şi cea florală precum şi în cazul mierei de mană, dependente de zona forestieră unde se practică apicultura (stejar, molid, brad-molid) iar în cazul mierei florale (salcîm sau tei) cu diferenţe în funcţie de perioada de colectare.

CONCLUZII

1) S-a constatat existenţa unor relaţii trofice evidente Lachnidae-Formicidae - Apinae, care influenţează asupra conţinutului în glucide al diferitelor provenienţe de miere florală şi de mană din zonele investigate.

2) S-au găsit diferite proporţii ale precipitării, prin metoda cu alcool cuprinse între 5—55% în diferitele probe investigate (miere de mană) precum şi între 5—8% în probele de miere florală.

3) Cromatogramele glucidelor arată prezenţa următoarelor componente glucidice : fructoză-sorboză, galactoză-glucoză, zaharoză, lactoză şi melicitoză care variază în funcţie de mierea florală şi cea de mană.

4) De asemenea s-au constatat variaţii în probele colectate din zone diferite, precum şi din aceeaşi zonă, în funcţie de specia de plantă gazdă şi de perioada de colectare.

Prezentat la redacţie la
27 martie 1974

Institutul de ştiinţe biologice
Laboratorul de Ecologie
Bucureşti

GLUCIDE CONTENT OF MILDEW AND FLOWER HONEY FROM VARIOUS SOURCES FOLLOWING NUTRITION RELATIONS IN LACHNIDAE-FORMICIDAE-APINAE

SUMMARY

Comparative research is made on glucide content of mildew honey and flower honey from various sources following nutrition relations in Lachnidae-Formicidae-Apinae. An obvious difference is established bet-

ween various sources of honey collected from various zones as a function of host species and period of collection.

BIBLIOGRAFIE

1. C. Bodea, *Tratat de biochimie vegetală*, Edit. Academiei R.S.R., București, 1964, p. 15.
2. I. Cîrnu, *Mierea de mană*, Editura „Apimondia", București, 1971, p. 150.
3. I. M. Haïs, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, București, 1960, p. 261.
4. W. Kloft, A. Maurizio, W. Kaeser, *Das Waldhonigbuch*, Ehrenwirth Verlag, München, 1965, p. 159.
5. D. Paraschivescu, St. cerc. Biol., Seria Zoologie, **24**, 355 (1972).
6. D. Paraschivescu, St. cerc. Biol., Seria Zoologie, **25**, 369 (1973).

ST. CERC. BIOCHIM., 18, 2, 135–142 (1975)

COMPORTAREA LA PROTEOLIZĂ A β-GLUCURONIDAZEI ÎN CURSUL PROCESULUI DE EXTRACȚIE DIN ȚESUT

SANDA RĂDULESCU și CECILIA MOTAȘ

Rezumat. — S-a purificat β-glucuronidaza din rinichi de șobolan după metoda Stahl și Touster (5). S-a lucrat pe probe de la 4 etape de purificare, respectiv I. omogenat, II. extract citoplasmatic, III. enzimă brută (precipitatul cu sulfat de amoniu 30%—70% saturație a extractului lizozomal) și IV. enzima purificată (cromatografia pe DEAE-celuloză în gradient discontinuu a enzimei brute). Comportarea lor la proteoliză s-a urmărit prin determinarea activității β-glucuronidazice în soluție și prin disc electroforeză la pH acid. La primele două etape de purificare s-au obținut prin metodele întrebuințate rezultate neconcordante care astfel au evidențiat indirect în citoplasmă un factor de inhibare a β-glucuronidazei. Totodată s-a demonstrat prezența majoră a β-glucuronidazei microzomale. În etapele următoare de purificare (III și IV) papaina a lucrat direct asupra β-glucuronidazei lizozomale, inactivînd-o. S-a demonstrat astfel că autoliza poate fi întrebuințată ca procedeu de purificare numai în cursul primelor două etape.

β-Glucuronidaza este o hidrolază acidă neobișnuită, deoarece se găsește în cantități mari atît în fracțiunea lizozomală cît și în cea microzomală a diferitelor tipuri de celule (1). Pentru separarea și purificarea ei s-au întrebuințat o serie de metode din care citățm pe cele mai noi (2—8).

Cunoscînd fiind, mai ales din lucrările lui Barrett, stabilitatea deosebită a enzimelor lizozomale la autoliză (9), unele din aceste metode au în cursul procesului de purificare o etapă de autoliză (2), (3), (4), (6).

Ultimele lucrări (5), (8) însă nu mai întrebuințează această etapă, ea fiind chiar criticată (7). Autoliza poate produce modificări în numărul și calitățile formelor multiple ale enzimelor lizozomale, respectiv ale β-glucuronidazei (7), (8).

Ne-am propus să urmărim relația între β-glucuronidază și o enzimă proteolitică ca papaina, adăogată în mediu, cu atît mai mult cu cît lucrîndu-se cu tirozinaminotransferaza, s-a observat că în omogenatele de ficat, la pH 5,0, enzima endogenă sau cea purificată și adăogată sînt inactivate de către lizozomii din omogenat cu o viteză similară aceleia de degradare a enzimei in vivo (10).

În felul acesta putea fi sesizată mult mai ușor prezența în omogenat a unor eventuali inhibitori sau activatori (6), (11), (12).

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe rinichi de șobolan, după metoda preconizată de Stahl și Touster (5).

Etapele de purificare sînt redate în tabela 1.

Tabela 1

Etape de purificare a β-glucuronidazei din rinichi de şobolan

I OMOGENAT 3 ml zaharoză 0,25 M/g ţesut

↓

Centrifugare 10 min la 2500 rpm

↓ ↓

Depozit; se spală de 2 ori — II EXTRACT CITOPLASMATIC (Supernatant de la 2500 rpm şi spălările depozitului)

↓

Centrifugare 40 min la 8500 rpm

↓ ↓

Lizozomi (depozit 8500 rpm) — Supernatant, se îndepărtează

Suspendare în tampon TRIS-fosfat 0,005 M, pH 7,8 5 ml/g ţesut (dializă)

↓

Centrifugare 3 ore la 11000 rpm

↓ ↓

Depozit, se îndepărtează — Precipitarea supernatantului cu $(NH_4)_2SO_4$ 30%—70%

↓

Centrifugare

↓ ↓

III Enzima brută (Precipitat) — Supernatantul se aruncă

↓

Cromatografie pe DEAE-celuloză, cu gradient discontinuu de NaCl în tampon TRIS-fosfat 0,005 M, pH 7,8

↓ ↓

0,1M — 0,25 M→IV Enzima purificată

Dozarea activităţii enzimatice s-a făcut după metoda descrisă de Musa şi colab. (13) : 0,1 ml soluţie enzimatică s-a adăugat în eprubete ce conţineau 0,1 ml substrat, 0,001 M fenolftalein-glucuronid şi 0,8 ml din 0,1 M tampon acetat, pH 4,3. S-au incubat la 37° C, 1 oră, după care reacţia s-a oprit cu 3,5 ml tampon NaOH-$NaHCO_3$, pH 10,5. Culoarea roşie a fenolftaleinei s-a citit la 550 nm. Microgramele de fenolftaleină s-au calculat pe o curbă etalon stabilită cu fenolftaleină.

Disc-electroforeza. Probele de la toate etapele de purificare au fost folosite pentru electroforeza în poliacrilamidă la pH 4,5 după metoda indicată de Reisfeld şi col. (14). cu tampon de 0,35 M β-alanină în cuvă. Proteinele s-au colorat cu amidoschwartz.

Activitatea enzimatică a fost evidenţiată prin apariţia discurilor de culoare roşie a fenolftaleinei după o incubare prealabilă a gelurilor în substratul fenolftalein-glucuronid, timp de 1 oră la 37°C, urmată de imersare în tampon NaOH—$NaHCO_3$, pH 10,5.

Hidroliza cu papaină. Probe de la toate etapele de purificare au fost supuse unei hidrolize cu papaină în raportul papaină/proteină 1/100, în

prezența a 0,01 M cisteină și 0,02 M EDTA, timp de 16 ore, la 37° C; pe materialul obținut s-au făcut dozări ale activității enzimatice și disc-electroforeză.

Concentrația proteică, pentru prima și a doua etapă de purificare s-a determinat după Aldridge (15), iar pentru următoarele etape, spectrofotometric la 280 nm.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conform etapelor de purificare redate în figura 1 s-au obținut patru preparate pe care s-au determinat concentrația proteică și activitatea β-glucuronidazică totală, exprimîndu-se activitatea specifică și activitatea specifică relativă (tabela 2).

Tabela 2

Purificarea β-glucuronidazei din rinichi de șobolan

	Stadii	Total proteine (mg)	Activitatea totală μg Ph	Activitatea specifică μg Ph/mg prot.	Activitatea specifică relativă
I.	Omogenat	1590	112	0,0705	1
II.	Extract citoplasmatic (supernatant 2500 rpm)	1300	234	0,18	2,5
	Lizozomi (depozit 8500 rpm)	550	187	0,34	5
III.	Enzimă brută $(NH_4)_2SO_4$ 30—70 % sat.)	97	1520	1,18	17
IV.	Enzimă purificată (cromatografiere) DEAE-celuloză)	7	1115	16,8	240

Se obține o purificare finală de 240 ori. Nu am continuat procesul de purificare, deoarece nu acesta a fost scopul lucrării noastre.

Comportările la proteoliză a β-glucuronidazei prezentă în cele patru preparate.

Pentru fiecare preparat s-au făcut următoarele determinări:

1. enzima cu papaină, cisteină și EDTA (37°C, 16 ore),
2. enzima cu papaină (37° C, 16 ore),
3. enzima cu cisteină și EDTA (37°C, 16 ore),
4. enzimă singură (37° C, 16 ore),
5. enzima martor de la frigider.

După 16 ore, pe o probă aliquotă s-a determinat activitatea β-glucuronidazică iar restul s-a folosit pentru electroforeză în disc. După terminarea migrării, gelurile s-au colorat în paralel pentru proteină și pentru activitatea β-glucuronidazică.

Deoarece la probele cu papaină singură și cu cisteină și EDTA singure nu s-au evidențiat modificări față de martor rezultatele nu au mai fost prezentate.

Rezultatele sînt prezentate în figurile 1, 2, 3 și 4.

Sînt date alternativ, activitatea enzimatică și spectrul proteic, în prezența papainei cu activatori, a autolizei și a martorului.

La omogenat se remarcă păstrarea activității enzimatice. Modificările proteice sînt evidente la activitatea papainei (fig. 1).

Și la extractul citoplasmatic activitatea enzimatică se păstrează egală, cu modificări proteice mari sub acțiunea papainei. La ambele etape de purificare autoliza de 16 ore la 37° C nu produce modificări decelabile prin disc-electroforeză, nici în spectrul proteic nici în activitatea β-glucuronidazei (fig. 2).

La enzima brută activitatea enzimatică dispare sub acțiunea papainei, iar aspectul proteic prezintă doar o singură bandă intensă și două foarte slabe. Autoliza produce față de martor o slabă scădere a activității enzimatice, fără modificări în spectrul proteic (fig. 3).

Și la enzima purificată se obțin rezultate asemănătoare celor de la enzima brută (fig. 4).

Din aceste rezultate ar reieși, final, că în omogenat și în extractul citoplasmatic se găsește un factor structural, capabil fie să protejeze β-glucuronidaza de acțiunea papainei adăugate, fie să inactiveze papaina. Odată cu trecerea la etapa de lizozomi, acest factor ar dispare, deoarece începînd de la acest stadiu, β-glucuronidaza este inactivată de papaină.

Stabilitatea la proteoliză a β-glucuronidazei este în acord cu metodele autorilor care întrebuințează autoliza ca etapă în procesul de purificare, autoliză fie a omogenatului (3), fie a extractului citoplasmatic (6).

Rezultatele obținute însă, prin dozarea activității în probele aliquote contrazic afirmațiile de mai sus (tabela 3).

Tabela 3

Comportarea la proteoliză a β-glucuronidazei

Stadii		Enzimă + papainā + activatori	Enzimă la 37°C, 24 ore	Enzimă martor
I.	Omogenat	0 ++++	40 ++++	45 ++++
II.	Extract citoplasmatic	11 +++	24 +++	27 +++
III.	Enzimă brută	0 −	14 +++	19 ++++
IV.	Enzimă purificată	0 −	11 +++	15 ++++

Activitatea enzimatică este exprimată în μg Ph/0,1 ml probă
+ și − reprezintă intensitatea culorii roșii a discurilor proporțională cu activitatea enzimatică (scară luată arbitrar de la ++++ la −)

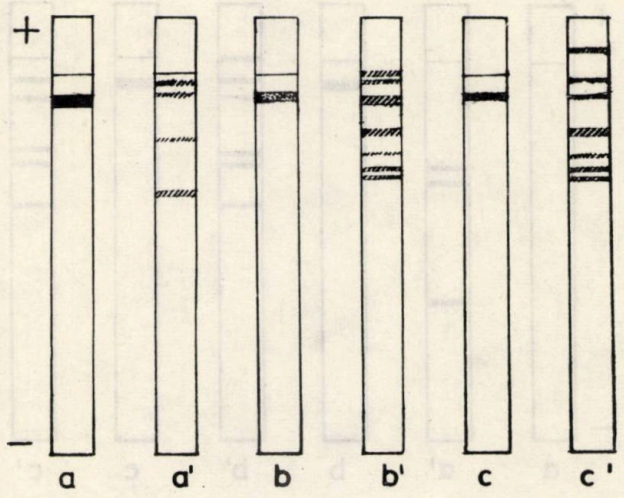


Fig. 1. Disc-electroforeza la pH 4,5 a omogenatului de rinichi. (I etapă).

a, b, c – reprezintă activitatea β-glucuronidazei *a* – omogenat cu papaină, cisteină şi EDTA *b* – omogenat la 37°C, 16 ore *c* – omogenat ţinut la frigider *a', b', c'* – reprezintă spectrul proteic de la probele respective.

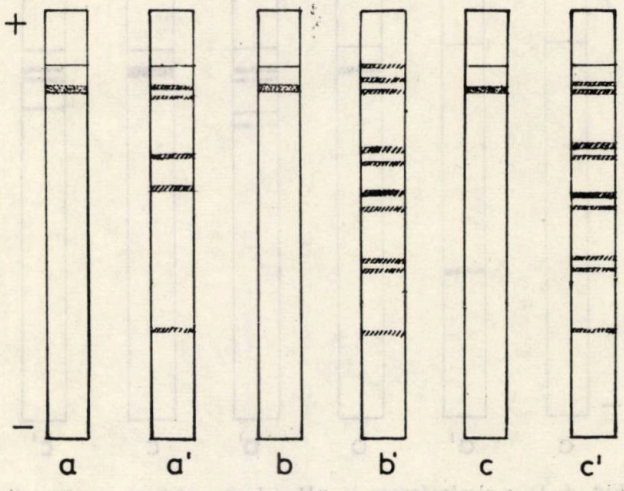


Fig. 2. Disc-electroforeza la pH 4,5 a extractului total (II etapă).
(aceleaşi notaţii de la fig. 1).

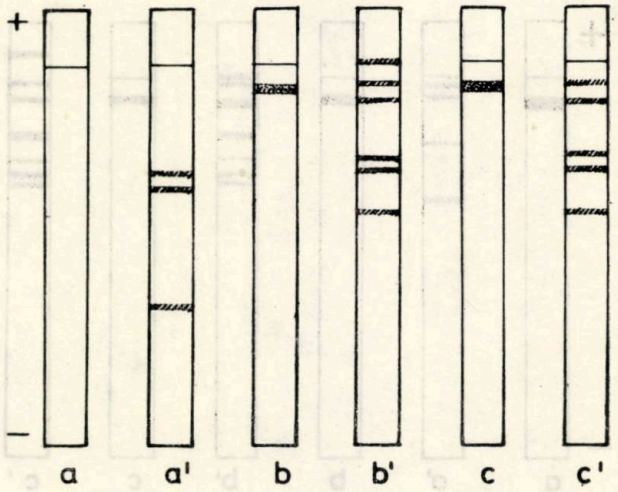


Fig. 3. Disc-electroforeza la pH 4,5 a ,,enzimei brute'' (precipitatul cu $(NH_4)_2SO_4$ 30 %—70 % saturație a extractului lizozomal).
(aceleași notații de la fig. 1).

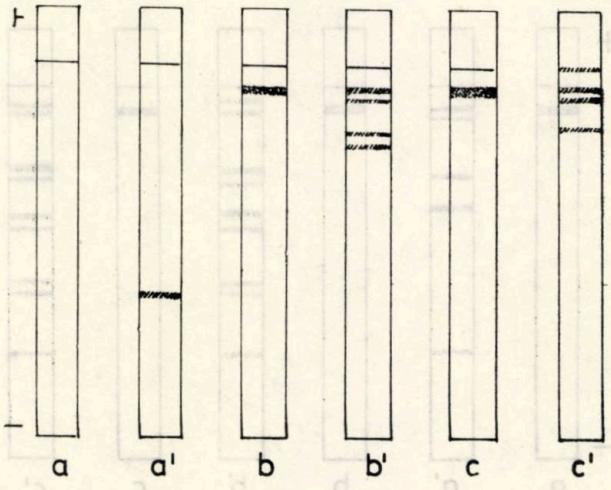


Fig. 4. Disc-electroforeza la pH 4,5 a ,,enzimei purificate'' (cromatografiere pe DEAE-celuloză a enzimei brute).
(aceleași notații de la fig. 1).

În primele două stadii de purificare, omogenat și extract proteic, activitatea enzimatică este zero sau foarte scăzută. Am fi tentați să credem că papaina a inactivat β-glucuronidaza. Numai că, coroborînd rezultatele probelor de la suspensii cu cele de la disc-electroforeză, constatăm că nici una din explicații nu este valabilă. Nu există în mediu un factor structural de protejare și nici papaina nu acționează direct asupra β-glucuronidazei. Rezultatele neconcordante la primele două stadii, pot fi explicate însă prin eliberarea de către papaină a unui factor inhibitor al β-glucuronidazei, care acționează în mediu, dar care se separă prin disc-electroforeză, β-glucuronidaza reluîndu-și activitatea. Nu are loc o degradare reală a enzimei. Dealtfel, prezența unei forme inactive a β-glucuronidazei este semnalată și de Dean (11).

Odată în prezența lizozomilor, factorul inhibitor dispare, deoarece de la acest stadiu de purificare în continuare, reiese că papaina lucrează direct pe β-glucuronidază, inactivînd-o, rezultatele de la inactivare fiind concordante la ambele etape. O tendință spre inactivare se observă și la rezultatele de la autoliză, prin ușoara scădere a activității enzimatice.

Rezultatele de inactivare a enzimei brute contrazic metoda preconizată de Delvin și Gianetto (4), care la acest stadiu, acționează cu tripsină, purificînd-o aproximativ de 10 ori. Rezistența la acțiunea tripsinei și susceptibilitatea la acțiunea papainei se pot datora ori timpilor deosebiți de acțiune (de 3 ori cîte 30 min și respectiv 16 ore), ori unei conformații deosebite a β-glucuronidazei susceptibilă numai la acțiunea enzimelor proteolitice —SH dependente.

Prin urmărirea comportării la proteoliza β-glucuronidazei, în cursul procesului de extracție din țesut s-a evidențiat indirect în citoplasmă un factor de inhibare a β-glucuronidazei, eliberat de acțiunea papainei. Totodată se confirmă existența în mediu proaspăt a unui factor inhibitor al degradării proteinelor cu viteze lente de turnover ca β-glucuronidaza, semnalată de Poore și Wibo (12).

Dacă luăm în considerare latența enzimelor lizozomale (1) și localizarea în cisterne și pe membranele microzomale a β-glucuronidazei, (8) (16) (17), cu lipsa de latență a enzimei din cisterne (8) se poate presupune că în primele două etape este prezentă numai enzima microzomală, pe cînd enzima lizozomală, devine preponderentă în etapele III și IV. Prezența unui inhibitor al enzimei microzomale din cisterne semnalată de Durante și col. (16) este confirmată de rezultatele noastre de la primele două etape de purificare, mai ales că enzima din cisterne este cea mai ușor solubilă.

CONCLUZII

— Adăugarea papainei în probe luate de la primele două etape de purificare a β-glucuronidazei a evidențiat indirect prezența în citoplasmă a unui factor de inhibare a enzimei microzomale, preponderentă în aceste preparate.

— În următoarele etape de purificare papaina a acţionat direct asupra enzimei lizozomale inactivînd-o.

— Autoliza poate fi întrebuinţată ca procedeu de purificare numai în cursul primelor două etape.

Prezentat la redacţie
la 1 iulie 1974

Colectivul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti

PAPAIN PROTEOLYSIS OF β-GLUCURONIDASE IN DIFFERENT STEPS OF EXTRACTION FROM TISSUE

SUMMARY

β-Glucuronidase was purified from rat kidney by the method of Stahl and Touster. Samples of four steps of purification : I — homogenate, II — cytoplasmic extract, III—crude enzyme (the precipitate with ammonium sulfate 30 — 70% saturation of lysosomal extract) and IV — purified enzyme (DEAE-cellulose chromatography in stepwise gradient of crude enzyme) were used. Their papain proteolysis was followed by β-glucuronidase activity assays in solution and in disc polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH.

The results for the first two steps did not agree with one another suggesting the presence of a β-glucuronidase cytoplasmic inhibitor. In these steps the most abundant was the microsomal form. In the next two steps, papain inactivated directly the lysosomal enzyme.

Our results indicate that autolysis may be useful for β-glucuronidase purification only in the first two steps.

BIBLIOGRAFIE

1. C. de Duve, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans, Biochem. J., **60**, 604 (1955).
2. B. V. Plapp, R. D. Cole, Arch. Biochem. Biophys., **116**, 193 (1966).
3. B. V. Plapp, R. D. Cole, Biochemistry, **6**, 3637 (1967).
4. E. Delvin, R. Gianetto, Biochim. Biophys. Acta, **220**, 93 (1970).
5. P. D. Stahl, O. Touster, J. Biol. Chem., **246**, 5398 (1971).
6. R. T. Dean, Biochem. J., **138**, 395 (1974).
7. N. Himeno, Y. Hashiguchi, K. Kato, J. Biochem., **76**, 1243 (1974).
8. J. W. Owens, K. L. Gammon, P. D. Stahl, Arch. Biochem. Biophys., **166**, 258 (1975).
9. A. J. Barrett, în *Lysosomes : A laboratory handbook*, ed. J. T. Dingle, North-Holland Publishing Co, Amsterdam and London, 1972, 46 p.
10. F. Auricchio, în *Symposiuum Intracellular Protein Catabolism*, Gotha, R.D.G., mai 1973, p. 27.
11. R. T. Dean, Biochem. J., **138**, 407 (1974).
12. B. Poole, M. Wibo, în *Symposium Intracellular Protein Catabolism*, Gotha, R.D.G., mai 1973, p. 23.
13. B. U. Musa, R. P. Doe, U. S. Seal, J. Biol. Chem., **240**, 2811(1965).
14. R. A. Reisfeld, U. J. Lewis, D. E. Williams, Nature, **195**, 281 (1962).
15. W. N. Aldridge, Biochem. J., **62**, 423 (1957).
16. M. Durante, A. Cori, L. Barsanti, Ital. J. Biochem., **23**, 292 (1974).
17. L. Mameli, R. Gianetto, Biochem. Biophys. Res. Com., **50**, 316 (1973).

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viața științifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștința cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : str. Docenților nr. 20, București 2, Sectorul I.

1975 OKT 25

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare,** 1970, 240 p., 20,50 lei.

I. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară,** 1971, 420 g., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza,** 1972, 243 p., 5pl., 13 lei.

V.D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere,** 1972, 180 p., 2pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU–VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula Structură şi funcţii,** 1972, 344 p., 12pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii,** 1972, 184p., 4 pl., 15 lei.

I. V. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi,** 1973, 255p., 10,50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 18 NR. 2, P. 65 – 142, BUCUREŞTI, 1975

I.P Informaţia c. 420

43816

Lei 20